

LÍLIAN ALVES CARVALHO REIS

**IDENTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS RELACIONADAS À  
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM CLONES COMERCIAIS DE *Eucalyptus*  
*spp* E *Corymbia spp*.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R375i  
2018  
Reis, Lílian Alves Carvalho, 1985-  
Identificação de características fisiológicas relacionadas à  
tolerância ao déficit hídrico em clones comerciais de *Eucalyptus*  
spp. e *Corymbia* spp. / Lílian Alves Carvalho Reis. – Viçosa,  
MG, 2018.

xi, 145 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Eucalipto  
- Fisiologia. 3. Balanço hidrológico. 4. Clonagem.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

II. Título.

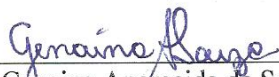
CDD 22. ed. 583.766

LÍLIAN ALVES CARVALHO REIS

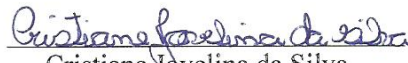
**IDENTIFICAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS  
RELACIONADAS À TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO EM CLONES  
COMERCIAIS DE *Eucalyptus spp.* E *Corymbia spp.***

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

APROVADA: 31 de julho de 2018.



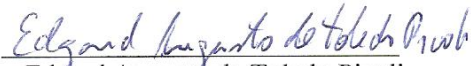
Genaina Aparecida de Souza



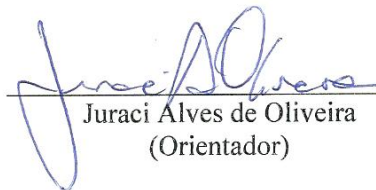
Cristiane Jovelina da Silva



Cléberon Ribeiro



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Juraci Alves de Oliveira  
(Orientador)

Ao meu pai, Darwin Carvalho Reis, à minha mãe, Angelina Alves Reis, à minha irmã, Letícia Alves Carvalho Reis, ao meu namorado Antônio Marcos Rosado pela dedicação, carinho, investimento de vida e por sempre terem acreditado em mim.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos anjos que ele me enviou ao longo da vida e do doutorado.

Agradeço a oportunidade de aprendizado e superação que me foi concedida pelo doutorado da Fisiologia Vegetal e pela Ferbasa ao longo de três, dos cinco anos de doutorado. Sempre que imaginei que não conseguia mais, fui instigada a superar meus limites. E quando as forças eram poucas e faltavam mãos, os anjos no formato de amigos, estagiários, irmã, namorado, orientador, gerente e diretor, de alguma forma, tornavam a caminhada possível. A maior lição de todas as grandes lições do doutorado é que em equipe mesmo os grandes problemas ganham soluções.

Agradeço à minha família, meu pai Darwin Carvalho Reis (in memoriam) pelo exemplo de força, honestidade e carinho. Ele fez muita falta quando o medo ficou grande, mas foi o maior motivo para a luta diária. Agradeço à minha mãe que me ensinou com seu exemplo de braveza e disciplina, que a vida não é fácil e que temos que ser fortes. Agradeço à minha irmã que sempre esteve por perto, me apoiando e ajudando. A ela agradeço aos dias suados de estufa e sujos de terra que passamos em meio a sorrisos, tornando tudo mais leve com sua presença. Agradeço à minha madrinha Clotildes Orsine Reis pelos conselhos, conversas e compreensão pela minha ausência.

Agradeço à família Rosado por ter me acolhido com tanto carinho em Viçosa, agradeço ao meu companheiro e amigo Antônio, por todos os dias e madrugadas de companheirismo e trabalho, no campo, em casa e no laboratório. Assim como também agradeço à Aline pelas brincadeiras e travessuras que tornaram esse período mais familiar e amoroso. Agradeço também ao Whisky e à Tekila que deixaram os meus dias mais humanizados com suas latidas, lambibeijos e patinhas.

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao programa de pós-graduação da Fisiologia Vegetal por todas as lições e por ter autorizado que eu fizesse o doutorado enquanto trabalhava em uma empresa. Agradeço principalmente ao professor Juraci pelo apoio, carinho, exemplo e confiança durante todo esse trabalho. Tive o melhor orientador que alguém pode ter! Agradeço ao professor Edgard pela coorientação, carinho e paciência! Agradeço também a todos os colegas de curso, mas principalmente às minhas duas afilhadas de casamento que são como minhas irmãs (Talita e Raquel). Agradeço também à Fernanda Farnezi por todo carinho e acolhimento no início do curso. Agradeço a todos os estagiários que foram muitos e que em muitos momentos foram minhas mãos, braços e pernas na execução das atividades. Agradeço à

Leila, técnica do laboratório de tecnologia da madeira e ao Leonardo do laboratório de Anatomia e morfogênese de plantas pelo apoio e dedicação.

Agradeço à Ferbasa, pela oportunidade de trabalho na área que me preparei para trabalhar e pelo apoio e patrocínio do projeto de Doutorado. Agradeço principalmente por ter permitido que eu desse apoio à minha família quando ela mais precisou, sem ter que abrir mão do sonho de terminar o doutorado. E agradeço em especial aos Senhores Sebastião, pela orientação e confiança, e Armando pelo brilhante planejamento e apoio, mas agradeço também a todos os meus colegas de trabalho que deram força e apoio ao longo do doutorado.

Agradeça à Aperam Bionergia e a Copener por terem cedido os materiais biológicos para os estudos!

Agradeço ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NuBioMol), por fornecer as instalações para a avaliação dos experimentos; agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenador de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SISNANO) / Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

A todos os funcionários, professores e colegas que, de alguma forma, contribuíram para minha formação acadêmica e profissional e a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

LÍLIAN ALVES CARVALHO REIS, filha de Angelina Alves e Darwin Carvalho Reis, nasceu em 10 de outubro de 1985, na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. Graduou-se em Agronomia em julho de 2010 pela Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri. Iniciou o mestrado em Produção Vegetal em março de 2011 na Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, tendo defendido dissertação em julho de 2013. Iniciou o doutorado em Fisiologia Vegetal em julho de 2013 na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em julho de 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivo geral</b> .....	<b>3</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>5</b>
<b>Influência do crescimento de clones de eucalipto na tolerância diferencial ao déficit hídrico</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
Material vegetal .....	<b>7</b>
Análises de crescimento e trocas gasosas .....	<b>9</b>
Determinação do teor relativo de água .....	<b>9</b>
Análise estatística .....	<b>10</b>
Univariada.....	<b>10</b>
Multivariada.....	<b>11</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>12</b>
Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico) .....	<b>26</b>
Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico).....	<b>30</b>
Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico).....	<b>33</b>
Análise de Correlações Canônicas (Irrigação Ideal).....	<b>35</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>43</b>
<b>Influência do metabolismo enzimático antioxidante em clones de eucalipto na</b>	

<b>tolerância ao déficit hídrico.....</b>	<b>43</b>
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
Material vegetal .....	45
Análises de trocas gasosas .....	47
Condutância estomática e Fv/Fm.....	47
Avaliações quanto ao status hídrico da planta .....	48
Avaliação do sistema antioxidante enzimático .....	48
Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) .....	48
Determinação da atividade da catalase (CAT, EC1.11.1.6).....	49
Determinação da atividade das peroxidases totais (POX, EC1.11.1.7) .....	49
Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11).....	49
Avaliação do sistema antioxidante não enzimático .....	50
Determinação da concentração de glutathiona total (GSH + GSSG) .....	50
Determinação da concentração de ascorbato e desidroascorbato .....	50
Determinação do teor de prolina no material vegetal .....	50
Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos e antocianinas .....	51
Concentração de espécies reativas de oxigênio .....	51
Análise estatística.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	54
Análise estatística univariada.....	54
Análise estatística multivariada .....	64
Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico) .....	64
Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico) .....	67
Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico).....	71
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>78</b>
<b>Síntese de metabólitos em eucalipto sob déficit hídrico.....</b>	<b>78</b>

INTRODUÇÃO .....	78
MATERIAIS E MÉTODOS .....	79
Material vegetal .....	79
Análises de crescimento.....	82
Quantificação de fitohormônios.....	82
Extração etanólica para análises de metabólitos e proteínas solúveis.....	82
Determinação da concentração de açúcares solúveis.....	83
Determinação da concentração de aminoácidos livres .....	83
Determinação da concentração de açúcares solúveis.....	83
Determinação da concentração de proteínas solúveis totais .....	84
Determinação da concentração de amido.....	84
Determinação de prolina.....	85
Análise estatística .....	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
Análise univariada .....	87
Análise Multivariada.....	97
Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico) .....	97
Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico) .....	103
Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico).....	106
CONCLUSÕES .....	109
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>112</b>
<b>Análises morfoanatômicas em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico.</b>	<b>112</b>
INTRODUÇÃO .....	112
MATERIAIS E MÉTODOS .....	114
Material vegetal .....	114
Análises de crescimento e trocas gasosas .....	116
Análises anatômicas.....	116

Análise nutricional .....	118
Análise estatística.....	118
<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>120</b>
Análise estatística multivariada .....	131
Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico) .....	131
Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico).....	135
Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico).....	138
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>142</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>145</b>

## RESUMO

REIS, Lílian Alves Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Identificação de características fisiológicas relacionadas à tolerância ao déficit hídrico em clones comerciais de *Eucalyptus spp.* e *Corymbia spp.***. Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

O déficit hídrico é o maior limitante à produtividade de Eucalipto, portanto, faz-se necessário incluir análises que permitam a seleção de indivíduos superiores em programas de melhoramento genético com o objetivo de aumentar a produtividade. Contudo, existem muitas variáveis relacionadas à tolerância ao déficit hídrico. Assim, o objetivo desse estudo foi selecionar variáveis que permitam a seleção precoce de indivíduos tolerantes ao déficit hídrico. No primeiro capítulo, características ligadas ao crescimento foram avaliadas e foi observado que as variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram: peso seco do caule, peso total da planta, taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração, incremento % em altura, teor relativo de água, suculência e relação  $C_i/C_a$ . No segundo capítulo, variáveis relacionadas ao metabolismo enzimático antioxidante e estresse hídrico foram avaliadas, sendo que as variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram fotossíntese, relação  $F_v/F_m$ , clorofila a, clorofila b e glutatona. No terceiro capítulo, variáveis relacionadas à síntese de metabólitos foram avaliadas. As variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram fotossíntese, relação  $F_v/F_m$ , clorofila a, clorofila b e glutatona, ácido abissico, metil jasmonato e glicose. No quarto capítulo, variáveis morfoanatômicas e nutricionais foram avaliadas. As variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram condutância estomática, relação  $F_v/F_m$  e concentração de cálcio. As variáveis peso total da planta, incremento em altura %, teor relativo de água são úteis na seleção e, como vantagem adicional, essas análises requerem instrumentos simples como balança, estufa e fita métrica. Para as variáveis fotossíntese, relação  $F_v/F_m$  e Condutância estomática é necessário o uso do equipamento IRGA. Assim sendo, essas variáveis podem ser facilmente usadas nas empresas para a seleção precoce de indivíduos com potencial para serem tolerantes em campo, desde que a avaliação do material genético seja feita sob condições de déficit hídrico natural ou simulada.

## ABSTRACT

REIS, Lílian Alves Carvalho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Identification of the Physiological Characteristics related to tolerance to water deficit in commercial clones of *Eucalyptus spp.* and *Corymbia spp.*** Advisor: Juraci Alves de Oliveira.

The water deficit is the major limiting factor to Eucalyptus productivity. Therefore, it is necessary to include analyzes that allow the selection of superior individuals in breeding programs with the objective of increasing productivity. However, there are many variables related to water deficit tolerance. Thus, the objective of this study was to select variables that allow the early selection of tolerant individuals to water deficit. In the first chapter, characteristics related to growth were evaluated and it was observed that variables most applicable to clones separation for tolerance were: dry stem weight, total plant weight, photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration, increase % in height, relative water content, succulence and Ci/Ca ratio. In the second chapter, variables related to antioxidant enzymatic metabolism and water stress were evaluated. The most applicable variables to clones separation for tolerance were photosynthesis, Fv/Fm ratio, chlorophyll a, chlorophyll b and glutathione. In the third chapter, variables related to the synthesis of metabolites were evaluated. The most applicable variables to clones separation for tolerance were photosynthesis, Fv/Fm ratio, chlorophyll a, chlorophyll b and glutathione, abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA) and glucose. In the fourth chapter morpho-anatomical and nutritional variables were evaluated. The most applicable variables to clones separation for tolerance were: stomatal conductance, Fv/Fm ratio and calcium concentration. The variables total plant weight, height increase %, relative water content are useful in selection and, as an additional advantage, these analyzes require simple instruments such as scale, greenhouse and tape measure. For the variables photosynthesis, Fv/Fm ratio and stomatal conductance, it is necessary to use the Infra-Red Gas Analysis - IRGA equipment. Therefore, these variables can be easily used in companies for the early selection of individuals with potential to be tolerant in the field, since the evaluation of the genetic material is done under conditions of natural or simulated water deficit.



## INTRODUÇÃO GERAL

A eucaliptocultura possui grande importância econômica nacional, pois vários produtos de consumo interno e de exportação são produzidos usando o eucalipto como matéria-prima, podendo ser citados: celulose, papel, móveis, carvão vegetal, painéis de madeira, madeira tratada e ligas de ferro. A produtividade nacional é, em média, de 35,7 m<sup>3</sup>/ha/ano (IBA 2017), e a produtividade baiana é, em média, de 34 m<sup>3</sup>/ha/ano (ABAF 2017). No entanto, a produtividade baiana pode ser aumentada por meio da identificação de árvores mais produtivas para a região, uma vez que existe disponibilidade de grande variabilidade genética ainda não explorada em programas de melhoramento genético no estado.

Embora a produtividade do *Eucalyptus spp.*, possa ser incrementada por seleção de materiais geneticamente superiores e alterações no manejo florestal, a mesma é limitada por vários estresses bióticos e abióticos (Pandey et al. 2017). Dentre os limitadores bióticos citam-se os fungos de lenho, como o *Ceratocystis spp* (Firmino et al. 2014), e os insetos: lagarta rosca, lagarta enroladeira, vespa da galha, formigas, pulgões e cochonilhas (Garlet et al. 2016). Os estresses abióticos, por sua vez, envolvem os ventos (Boschetti et al. 2015), que quebram as árvores, as elevadas ou baixas temperaturas (Oliveira et al. 2017), e as diferentes características do solo (Santos et al. 2017). Dentre os diversos estresses, destaca-se o déficit hídrico, pois ele é o maior limitante para a produtividade da eucaliptocultura. Vários estudos têm sido conduzidos em campo e em laboratório buscando simular o déficit hídrico e, assim, reduzir o tempo gasto para a seleção de genótipos superiores no melhoramento genético (Ferreira et al. 2017; Jung et al. 2017). No entanto, poucos são os ensaios em casa de vegetação que buscam simular as condições de campo, para que, dessa maneira, possam identificar variáveis úteis em programas de melhoramento genético com o objetivo de plantio comercial.

A reduzida eficiência do processo de seleção ocorre, em parte, devido às características do ciclo hidrológico, associadas aos diversos tipos de solos, as quais são muito variáveis no território brasileiro. Em algumas regiões, pode ocorrer grande quantidade de chuva em um período de tempo muito curto, sendo esse o período normalmente utilizado para o estabelecimento inicial das plantas. Entretanto, como esses solos possuem camada de impedimento, como aqueles existentes no Tabuleiro Costeiro da região nordeste, são capazes de manter a umidade no período chuvoso, mas,

como esse período dura em torno de três meses, foi observado que, logo após, ocorre o estresse hídrico, agravado pela elevação da temperatura. Dessa forma, as plantas têm pouco tempo para se adaptar ao estresse hídrico, pois essa transição entre o período chuvoso e ausência de chuva é bastante abrupta e, alguns clones que são considerados tolerantes em outras regiões do país, podem não tolerar essas variações hidrológicas (Aspinwall et al. 2016).

Algumas características das plantas estão associadas ao aumento da tolerância ao estresse hídrico, as quais podem ser agrupadas em características morfológicas, anatômicas, fisiológicas e bioquímicas. Algumas plantas diminuem o número de folhas, outras produzem maior quantidade de cera na superfície da folha ou maior quantidade de tricoma, ambas características morfológicas com o objetivo de reduzir a transpiração. Pode ocorrer aumento na espessura da lâmina foliar, para armazenar mais umidade e  $\text{CO}_2$  no interior da folha, e redução na densidade estomática e ou estômatos menores, todos os ajustes que permitem a redução da perda de água por transpiração. Algumas espécies possuem padrões metabólicos que permitem economia de água, como o metabolismo ácido das crassuláceas, e variações bioquímicas para produzir componentes osmoativos, como a prolina.

O melhoramento genético de plantas perenes, como o eucalipto, é, na maioria das vezes, um processo muito lento, ainda mais quando feito de maneira empírica através de seleções em campo por observações apenas do fenótipo. Mas pode ser acelerada a partir do uso de algumas ferramentas, como polinizações controladas com direcionamento dos cruzamentos, indução de florescimento precoce, escolha de materiais genéticos com potencial produtivo e seleção precoce de clones, com base nos valores fenotípico e genético das árvores.

A seleção precoce é uma ferramenta que usa características de plantas jovens como preditores para a performance dos indivíduos em idade produtiva e, dessa maneira, permite a redução do tempo para selecionar indivíduos superiores (Moraes et al. 2014). Segundo Pinto et al. (2014), essa tem sido uma eficiente ferramenta para o melhoramento genético de eucalipto, onde as características facilmente avaliadas podem ser denominadas como marcadores fenotípicos. Os marcadores presentes nas mudas relacionados à tolerância ao déficit hídrico em plantas adultas, podem ser úteis como preditores e, dessa forma, o presente estudo busca ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de tolerância ao déficit hídrico de clones comerciais de *Eucalyptus spp.*,

assim como identificar características que possam permitir selecionar precocemente clones tolerantes.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Identificar características de crescimento, fisiológicas e bioquímicas, para serem utilizadas em programa de melhoramento genético de eucalipto para seleção precoce de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

### **Objetivos específicos**

Selecionar clones de eucalipto de diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corimbia*, de importância econômica, em empresas privadas de relevância no setor florestal do Nordeste da Bahia, a partir de dados obtidos em campo para a tolerância diferencial ao déficit hídrico no solo, expor as plantas a diferentes condições hídricas e avaliar:

**Capítulo 1:** Avaliar o comportamento de 10 clones comerciais de eucalipto, quanto às características relacionadas ao crescimento, quando submetidos ao déficit hídrico.

**Capítulo 2:** Analisar as alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo antioxidante em 10 clones de eucalipto, selecionados em áreas diferentes do Brasil, e compará-los quanto ao nível de estresse e reação ao déficit hídrico.

**Capítulo 3:** Avaliar as alterações bioquímicas na síntese de compostos relacionados à tolerância ao déficit hídrico em 10 clones comerciais de Eucalipto.

**Capítulo 4:** Encontrar maior compreensão da relação entre características anatômicas e tolerância ao deficit hídrico.

## REFERÊNCIAS

Aspinwall MJ, Drake JE, Company C, Vårhammar A, Ghannoum O, Tissue DT, Reich PB, Tjoelker MG (2016) Convergent acclimation of leaf photosynthesis and respiration to prevailing ambient temperatures under current and warmer climates in *Eucalyptus tereticornis*. *New Phytologist* 212:354-367

ASSOCIAÇÃO BAIANA DAS EMPRESAS DE BASE FLORESTAL. Relatório ABAF 2017. Salvador, 2017. 2-26p.

Boschetti WTN, Paes JB, Oliveira JTS, Dudecki L (2015) Características anatômicas para produção de celulose do lenho de reação de árvores inclinadas de eucalipto. *Pesquisa agropecuária brasileira* 50:459-467

Ferreira DHAA, Leles PSS, Neto SNO, Paula TR, Coutinho RP, Silva RL (2017) Crescimento e produção de eucalipto na região do médio Paraíba do Sul, RJ. *Floresta e Ambiente* 24: 2179-8087

Firmino AC, Tanaka FAO, Silva SDVM, Ito MF, Furtado EL (2015) Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis spp.* isolado de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica* 41:138-143

Garlet J, Costa EC, Boscardin J (2016) Levantamento da entomofauna em plantios de eucalyptus spp. por meio de armadilha luminosa em São Francisco de Assis - RS. *Ciência Florestal* 26:0103-9954.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório 2017. São Paulo, 2017. 2-77p.

Jung LH, Lopes AS, Oliveira GQ, Oliveira JCL, Júnior EDF, Brito KRM (2017) Irrigation in initial development of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis*. *Ciências Florestal* 27:655-667

Moraes CB, Carvalho EV, Zimback L, Luz OSL, Pieroni GB, Mori ES, Leal TCAB (2015) Variabilidade genética em progênies de meios-irmãos de eucaliptos para tolerância ao frio1 *Revista Árvore* 39:1047-1054

Oliveira AS, Ribeiro A, Silva CRA, Xavier A, Freitas AF (2017) Modeling the growth of eucalyptus plants based on the thermal sum. *Revista Árvore* 41: 1806-9088.

Pandey P, Irulappan V, Bagavathiannan MV, Senthil-Kumar M (2017) Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in Plant Science* 8:0-587

Pinto DS, Resende RT, Mesquita AG, Rosado AM, Cruz CD (2014) Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. *Sci. For.* 42:251-257

Santos ACA, Silva S, Leite HG, Cruz JP (2017) Influência da variabilidade edafoclimática no crescimento de clones de eucalipto no Nordeste baiano. *Pesquisa Florestal Brasileira* 37:259-268

# CAPÍTULO 1

## **Influência do crescimento de clones de eucalipto na tolerância diferencial ao déficit hídrico**

### **Introdução**

O agronegócio tem grande importância econômica no Brasil, sendo responsável por parcelas cada vez mais significativas do produto interno bruto e, na área florestal, destaca-se a cultura do eucalipto (IBA 2017). A elevada demanda mundial por produtos e subprodutos advindos do eucalipto, como madeira, celulose e carvão, tem aumentado a necessidade de manutenção e/ou aumento de produtividade (ABAF 2017).

Entretanto, verifica-se que as culturas apresentam perdas de rendimento provocadas por estresses abióticos, sendo a seca o principal motivo de redução de produtividade vegetal (Fita et al. 2015). A disponibilidade de água, advinda das chuvas, está diretamente ligada à produção do eucalipto, onde cerca de 80% da variação no incremento médio anual florestal está relacionada à quantidade de água disponibilizada para o eucalipto por precipitação (Stape 2002).

Uma grande ameaça à produtividade vegetal em âmbito mundial e nacional são os fenômenos ambientais extremos, fruto das mudanças ambientais globais em andamento. Para esse cenário existem previsões de aumento de temperatura e de frequência de eventos de seca e, por consequência, redução da produtividade vegetal (Iizumi e Ramankutty 2015; Lesk et al. 2016).

Hernandez et al. (2016) analisaram, em plantas jovens, a condutância estomática, transpiração e fotossíntese, em conjunto com características de crescimento, para selecionar espécies de eucalipto resistentes à seca. Estudos semelhantes em casa de vegetação foram, também, desenvolvidos para espécies de eucalipto por Christina et al. (2015). Entretanto, esses estudos ainda não foram realizados simulando o regime de chuva no campo, de maneira que permita identificar características fisiológicas e/ou morfológicas que possibilitem a seleção precoce desses genótipos, para plantio em região com chuvas concentradas em três meses do ano e reduzida disponibilidade de água no solo.

Algumas características fenotípicas são modificadas e/ou demonstradas em situação de déficit hídrico para permitir a manutenção do status hídrico da planta. A

planta pode promover modificações na condutividade estomática e, por consequência, na taxa fotossintética, que também promoverá modificação quanto ao crescimento da planta (Chaves et al. 2009; Lauteri et al. 2014). Um dos principais efeitos da restrição hídrica sobre as plantas é a redução do crescimento devido à redução nas taxas fotossintéticas e ao menor alongamento das células da folha e do caule (Jaleel et al. 2009). No entanto, a redução na área foliar pode ser considerada um importante mecanismo de defesa contra a seca, pois com menor área foliar há uma menor transpiração (Tardieu et al. 2011).

O presente trabalho busca avaliar o comportamento de 10 clones comerciais de eucalipto, quanto às características relacionadas ao crescimento, quando submetidos ao déficit hídrico.

## Materiais e métodos

### Material vegetal

Dez clones comerciais, sendo cinco selecionados na região Nordeste de Minas Gerais (1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR) e cinco selecionados na região Norte da Bahia (6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC) (Tabela 1), os quais foram obtidos a partir do cruzamento das espécies representadas na Tabela 2. As mudas desses clones foram selecionadas visualmente quanto à uniformidade de desenvolvimento e sanidade; após, foram cultivadas em vasos plásticos, cobertos por saco plástico para impermeabilizar o vaso, com volume de cinco litros contendo solo peneirado de textura média (Tabela 2) e adubado com 10 g de Osmocote® de formulação NPK 19-6-10, com 3 repetições, e mantidos em viveiro de mudas coberto do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil no período entre 01/12/2015 a 08/04/2016.

**Tabela 1** - Identificação de clones comerciais.

Código	Cruzamento	Tolerância observada em campo	Grau de tolerância (observações de campo)	1º LOCAL DE SELEÇÃO
1CL	<i>E.cloeziانا</i>	Tolerância	6	Itamarandiba - MG
2TC	1/2 <i>C. torelliana</i> ; 1/2 <i>C. citriodora</i>	Tolerância	8	Periquito -MG
3UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	4	Itamarandiba - MG
4UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
5UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
6GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	2	Entre Rios - BA
7GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
8GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
9GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Entre Rios - BA
10UC	1/2 <i>E.camaldulensis</i> ; 1/2 <i>E.grandis</i>	Tolerante	10	Biritinga - BA

**Tabela 2** - Caracterização climática do ambiente natural de origem das espécies utilizadas no cruzamento para formação dos clones testados.

Espécies	Clima	Precipitação (mm)	Altitude (m)	Temperatura média max. (°C)
<i>C. torelliana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.cloeziana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	40-100	29-34
<i>E.urophylla</i>	Temperada, tropical e subtropical	1500-2800	200-1200	27-36
<i>C. citriodora</i>	Temperada, tropical e subtropical	800-1200	0-1200	27-39
<i>E.grandis</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.camaldulensis</i>	Deserto, temperado, equatorial, tropical e subtropical	150-1100	20-700	26-39

**Tabela 3** - Características físicas e químicas do Latossolo Vermelho + 30% de areia.

Análise granulométrica (kg.kg <sup>-1</sup> )												
Areia	Silte		Argila		Classe textura		Equivalente em umidade (Kg Kg <sup>-1</sup> )					
0,632	0,123		0,181		Franco arenoso		0,18					
Análise química (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )												
pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	m	V	
H <sub>2</sub> O	...(mg/dm <sup>3</sup> )...		.....(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ).....									.....%
5,46	5,7	8	0,71	0,09	0,0	0,8	0,82	0,82	1,62	2	50,6	

\* Análise realizada no laboratório de análise de solos, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa.

A capacidade de campo do solo foi calculada através do método do equivalente de umidade (EU), em que amostras peneiradas de solos, ou seja, amostras deformadas de solo, previamente saturadas com água, foram centrifugadas a 1000 xg, durante 30 minutos, ao potencial de -33 kPa (Cassel e Nielsen, 1986), depois, as amostras foram pesadas e levadas à estufa até atingirem massa seca constante. Foi considerada a capacidade de campo, a quantidade de água que permaneceu no solo após a centrifugação, que calculada pela diferença entre o peso úmido do solo e o peso seco, passou a ser considerada a quantidade de água necessária para atingir 100% da capacidade de campo do solo.

As mudas foram irrigadas por três meses para adaptação ao substrato e ao ambiente e para simulação das condições de chuva em campo, com lâmina de água ideal para atingir 90% da capacidade de campo do solo (CC) e, após esse período, foram aplicados os tratamentos durante 40 dias, sendo 50% da capacidade de campo do solo (CC), simulando déficit hídrico, e 90% da CC, simulando irrigação ideal.

### **Análises de crescimento e trocas gasosas**

As variáveis de crescimento foram mensuradas no início do plantio e no final do experimento, com análises morfológicas de altura (cm), diâmetro de coleto (mm), número de folhas, área foliar (cm<sup>2</sup>), peso da folha, do caule e raiz.

As avaliações das trocas gasosas, realizadas entre 08:00 h e 11:00 h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante (1000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração atmosf\u00e9rica de CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade ambientes, no segundo par de folhas completamente expandida (V4), por meio do analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluor\u00f4metro (modelo LI-6400xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA), resultaram nos seguintes par\u00e2metros: taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida do CO<sub>2</sub> (A), condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (gs), taxa transpirat\u00f3ria (E), d\u00e9ficit de press\u00e3o de vapor (DPV). A efici\u00eancia instant\u00e2nea do uso da \u00e1gua (EUA) foi calculada pela raz\u00e3o A/E. As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila foram obtidas na mesma folha utilizada na medi\u00e7\u00e3o das trocas gasosas, utilizando o fluor\u00f4metro acoplado ao IRGA.

Com as vari\u00e1veis registradas nas plantas adaptadas ao claro e ao escuro, foram obtidos e/ou calculados os seguintes par\u00e2metros: o rendimento qu\u00e2ntico potencial do PSII (Fv/Fm) e a taxa aparente de transporte de el\u00e9trons (ETR) (Genty et al. 1989; Bilger et al. 1995).

### **Determina\u00e7\u00e3o do teor relativo de \u00e1gua**

O status h\u00eddrico das plantas foi avaliado no \u00faltimo dia do experimento, em folhas completamente expandidas, localizadas na altura mediana de cada planta. O teor relativo de \u00e1gua (TRA) foi obtido a partir de 3 discos foliares, com 0,5 cm de di\u00e2metro cada, pesados (MF) e transferidos para placas de Petri, onde permaneceram submersos em \u00e1gua, durante seis horas. Em seguida, novamente pesados para determinar a massa t\u00fargida (MT) e colocados para secar a 70\u00b0C, por 72 horas, para obten\u00e7\u00e3o da massa seca

(MS) (Catsky, 1974). Os valores de TRA (%) foram obtidos a partir da seguinte fórmula:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{(\text{MF} - \text{MS}) \times 100}{(\text{MT} - \text{MS})}$$

A suculência foliar foi calculada pela razão MF/A, onde MF representa a massa fresca de 10 discos foliares e A representa a área desses discos, conforme descrito por Silveira et al. (2009).

## **Análise estatística**

### **Univariada**

Os experimentos foram realizados de acordo com um esquema fatorial 2x10 (2 capacidades de campo e 10 clones diferentes), com 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com uma planta. Foram avaliados dois percentuais da capacidade de campo do solo (CC), aplicados de acordo com a diferença de peso do sistema (vaso, solo, tutor e água) para atingir (50% e 90% CC) simulando, respectivamente deficit hídrico e irrigação ideal.

Em relação às variáveis, foi feito teste de Normalidade dos resíduos (teste Shapiro-Wilk a 5% de significância), todas variáveis foram submetidas à ANOVA e a estimativa dos parâmetros genéticos, obtidas utilizando software GENES/UFV no modelo fatorial simples:

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = m + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : valor fenotípico do caráter Y medido no material genético i, no ambiente j

m: média geral paramétrica dos dados em estudo

$G_i$ : efeito do i-ésimo genótipo

$B/A_{jk}$ : efeito de blocos dentro de ambiente

$A_j$ : efeito do j-ésimo ambiente experimental

$GA_{ij}$ : efeito da interação do i-ésimo genótipo com o j-ésimo ambiente

$E_{ijk}$ : erro médio associado à observação  $Y_{ijk}$

Considerando o efeito de genótipo como fixo e o efeito de ambiente aleatório.

Para a comparação entre as médias de cada clone, para cada variável, foi realizado o teste de média, Tukey (5% de probabilidade). O resultado foi apresentado em gráfico para cada variável, priorizando a disposição das barras conforme o ranqueamento dos clones, do maior para o menor valor da característica, considerando o ambiente com deficit hídrico, facilitando a visualização do comportamento dos materiais genéticos considerados susceptível e tolerante.

## **Multivariada**

As análises de componentes principais, variáveis canônicas e correlação canônica foram realizadas utilizando o Software GENES (Cruz 2013). A partir dos valores de correlação canônica, podem-se resumir as informações do conjunto de variáveis relacionadas às mudas de clones de eucalipto para os 10 materiais avaliados, a partir de combinações lineares, a fim de maximizar a correlação com o conjunto de variáveis que denotem a tolerância ao deficit hídrico desses materiais.

As variáveis que possuem correlação direta com outras variáveis não entraram no cálculo correlação canônica, nem nas demais análises que pudessem ser prejudicadas, uma vez que a correlação poderia interferir no resultado se ambas as variáveis fossem analisadas juntas (multicolinearidade).

As combinações lineares construídas foram chamadas de variáveis canônicas, enquanto a correlação entre elas foi chamada de correlação canônica. Essa correlação mede basicamente o grau de associação existente entre os dois conjuntos de variáveis (Mingoti, 2005). Buscaram-se combinações lineares que possibilitavam a maximização da correlação entre elas. O primeiro par canônico foi aquele com a maior correlação entre as variáveis canônicas. Em seguida, foram calculadas outras duas variáveis canônicas – outro par canônico – com a condição de serem ortogonais as primeiras e terem o máximo coeficiente de correlação. O segundo par, portanto, apresentou a segunda maior correlação entre as variáveis canônicas, e assim sucessivamente. O coeficiente de correlação canônica utilizado foi o valor absoluto do coeficiente de correlação de Pearson, entre as variáveis canônicas de cada par canônico, conforme sugerido por Mingoti (2005).

Buscou-se separar os clones conforme suas características, que conferiram tolerância das mudas à condição de deficit hídrico, por meio da análise dos componentes principais e variáveis canônicas.

## Resultados e Discussões

As plantas apresentam redução de crescimento e produção devido a estresses abióticos que afetam o crescimento no campo, sendo a seca o principal fator ambiental adverso enfrentado por elas (Fita et al. 2015). No presente trabalho, observou-se que, para as variáveis de crescimento, as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram menores valores do que as plantas adequadamente irrigadas (Figura 1), conforme observado por Dos Santos et al. (2016) em plantas de cacau.

Ocorreram diferenças estatísticas entre os clones e entre os tratamentos, déficit hídrico, condição ideal de irrigação para a variável incremento de volume do caule (Figura 1A). Pode-se observar na (Figura 1B) que, para a variável incremento em altura percentual, ocorreu diferença estatística entre os tratamentos e entre os clones, sendo que as mudas submetidas ao déficit hídrico tiveram menor incremento comparado com as mudas dos mesmos clones em condição ideal de irrigação. Nas plantas submetidas ao déficit hídrico, o incremento percentual máximo em altura foi de 122,9% e mínimo de 6,63%, para as plantas com irrigação ideal o incremento máximo percentual foi de 144,19% e mínimo de 44,08%.

Entre os clones, os que obtiveram melhor desenvolvimento em ambos os tratamentos, foram os clones 2 TC, seguido pelo 10 UC e o 1 CL, os quais são classificados como tolerantes ao déficit hídrico na condição de campo. Os piores desempenhos sob déficit hídrico foram os clones 6 GU, 5 UR e, por último, 8 GU. O clone 6 GU, em campo, apresenta bom desenvolvimento em áreas sob alagamento e costuma ser indicado para ser plantado em áreas marginalizadas, pouco produtivas, mas não é considerado tolerante ao déficit hídrico, o que foi confirmado no presente trabalho. O clone 8 GU teve crescimento mediano quando em irrigação ideal e, sob déficit hídrico, reduziu muito o crescimento, demonstrando ser sensível, assim como o clone 5 UR, que apresentou baixo incremento em altura, tanto na situação de déficit hídrico como em irrigação ideal.

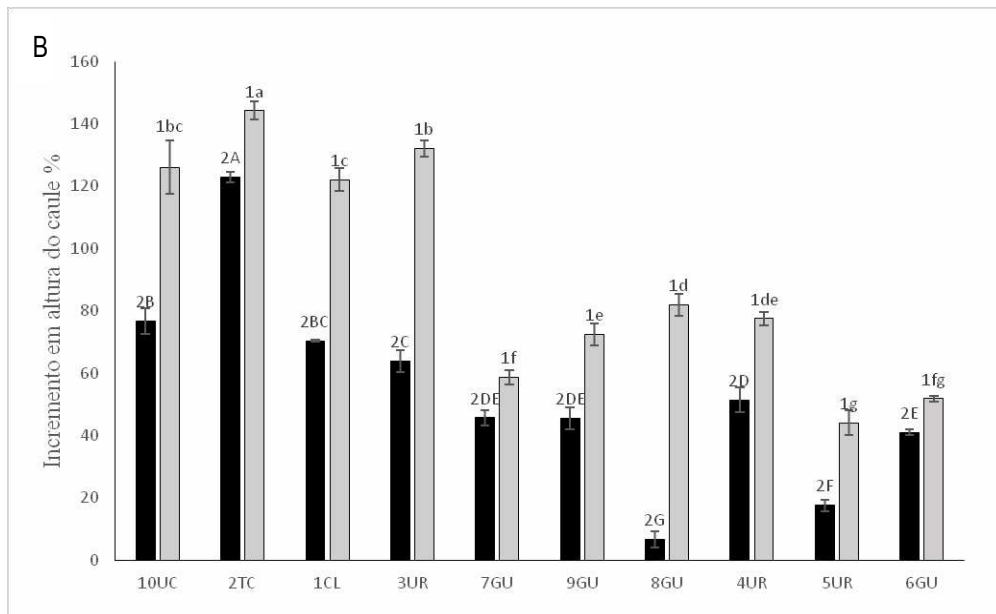
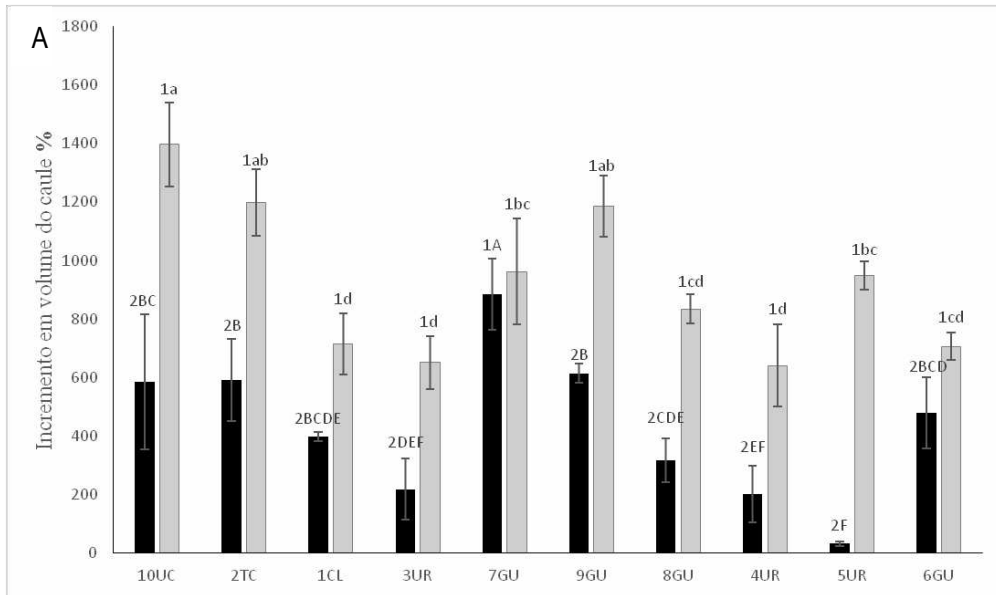
Para a variável diâmetro do caule (Figura 1C), o clone 7 GU apresentou o maior incremento sob déficit hídrico, e o menor incremento foi obtido no clone 5 UR. No entanto, o clone 5 UR obteve o segundo maior incremento em diâmetro em condição ideal de irrigação, demonstrando ser sensível ao déficit hídrico quando avaliada somente

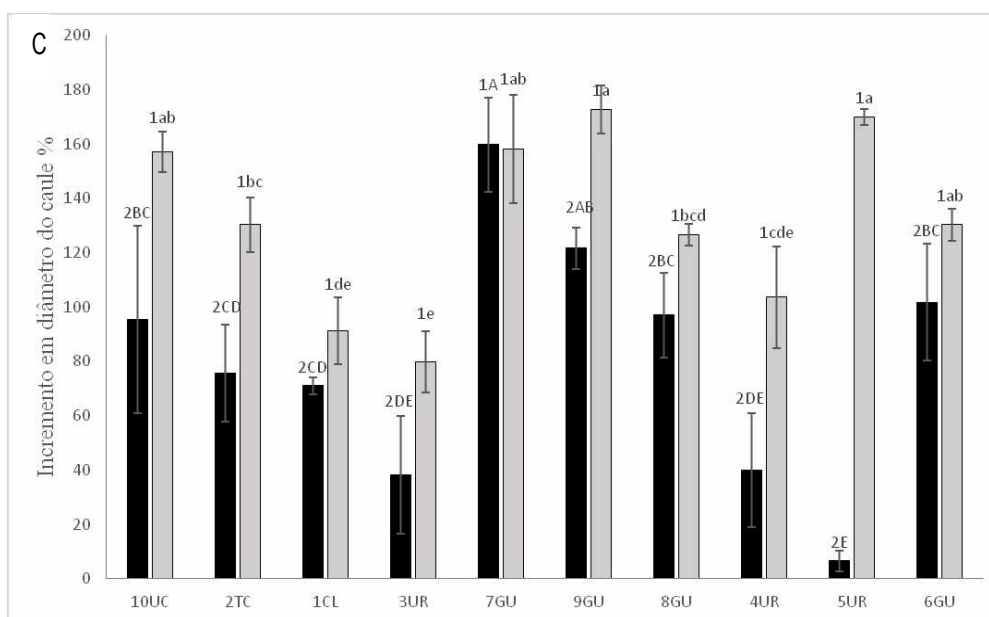
essa variável. O clone 9 GU obteve diferença significativa entre os tratamentos, mas foi um dos que obtiveram maior incremento em ambas as situações.

A variável volume de caule é mais representativa que o diâmetro de caule e altura da planta, pois o volume está relacionado com o produto final (volume do troco) que será vendido e é calculado usando as duas variáveis: altura e diâmetro do tronco. O único clone que não apresentou diferença estatística entre os ambientes foi o 7 GU, mas foi o que obteve melhor desenvolvimento em incremento percentual em volume (Figura 1A) sob déficit hídrico. No entanto, por apresentar menor desenvolvimento em condições ideais, ele não é um clone indicado para plantio em condições ideais de irrigação, pois o seu crescimento é limitado.

Os clones 2 TC e 10 UC, considerados tolerantes em campo, apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e obtiveram maior incremento quando em condição ideal de irrigação, porém, não demonstraram correlação entre o rank da variável “incremento de volume” com o rank em campo para “tolerância a déficit hídrico”, indicando que volume não é uma boa variável para relacionar a tolerância a déficit hídrico. O clone 1 CL, também considerado tolerante, ficou em colocações inferiores nos ranqueamentos de ambos ambientes, considerando a variável incremento de volume. O clone 2 TC obteve o terceiro melhor incremento em volume sob déficit hídrico e o segundo melhor incremento em condição ideal de irrigação, podendo ser indicado para o plantio em ambas as situações. Como vantagem adicional, cita-se o fato de ser um clone 1/2 *C. torelliana* e 1/2 *C. citriodora*, com potencial para produzir madeira de alta densidade e, conseqüentemente, gerar carvão de melhor qualidade. Os clones 3 UR e 4 UR apresentaram diferença estatística entre os ambientes, mas praticamente não modificaram suas posições nos ranqueamentos, ficando sempre entre os últimos colocados para ambos os ambientes.

Corroborando com os resultados obtidos, Stape (2008) destaca que a disponibilidade de água está diretamente relacionada ao crescimento do caule do Eucalipto, o que foi também observado por McKiernan et al. (2017), onde indivíduos de *E. globulus* submetidos ao déficit hídrico apresentaram redução no crescimento mesmo antes de apresentarem redução do potencial hídrico foliar. O déficit hídrico reduz o crescimento e evapotranspiração (Fernandes et al. 2015) e provoca redução da área foliar e da altura das plantas de *Eucalyptus* (Shvaleva et al. 2005; Christina et al. 2015).





**Figura 1** - Incremento em volume do caule % (A), incremento de altura % (B) e incremento diâmetro de caule % (C) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) ■ controle (CC 90%) □ Médias com diferentes letras maiúsculas e minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones, dentro do tratamento déficit hídrico e irrigação adequada, respectivamente. Para o mesmo clone, números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

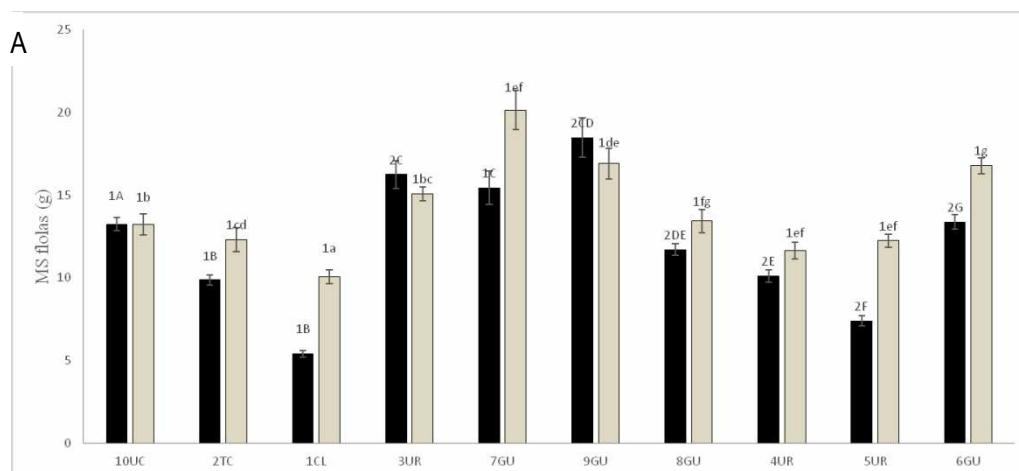
A maioria dos clones apresentou diferença estatística entre os tratamentos quanto à variável peso seco de folhas (Figura 2A), com uma única exceção, o clone 10 CU. Os clones 3 UR e 9 GU apresentaram maior peso seco de folhas quando submetidos ao déficit hídrico, diferindo do desenvolvimento dos demais clones que apresentaram menores valores quando submetidos ao déficit hídrico. Observa-se que, sob déficit hídrico, é comum ocorrer a perda de algumas folhas para reduzir a transpiração e aumentar o tempo de sobre vida (Chaves et al. 2003; Tardieu et al. 2011). Uma estratégia usada por algumas empresas, antes de um período seco e após um ano de plantio para simular essa habilidade, é a poda do terço inferior da copa das plantas, que, além de diminuir a transpiração melhorando a tolerância à seca, facilita diversas operações silviculturais, como o controle mecanizado de plantas daninhas, que reduz a competição por água no período crítico de seca. A ausência das folhas baixas devido à poda reduz, também, significativamente o contato indesejado do herbicida com as folhas do eucalipto devido ao efeito de deriva nas operações mecanizadas e facilita o monitoramento de formiga.

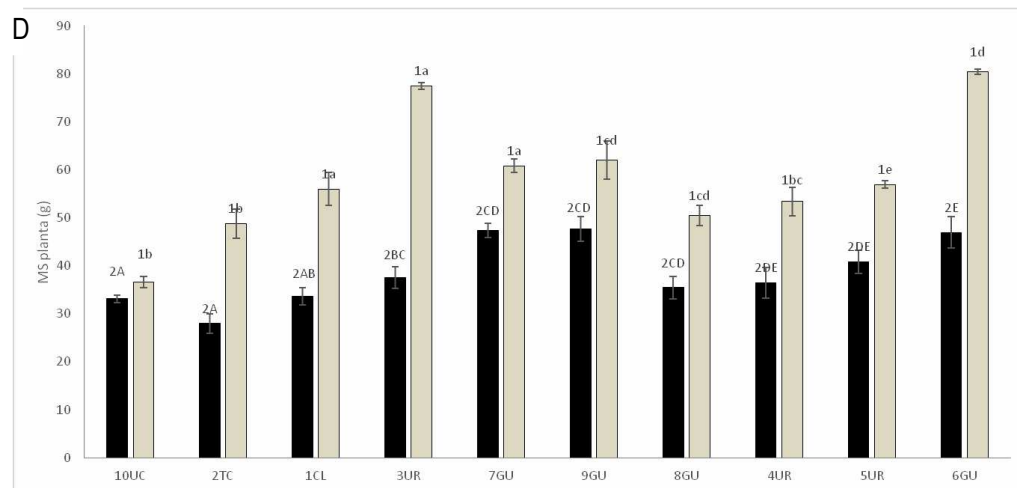
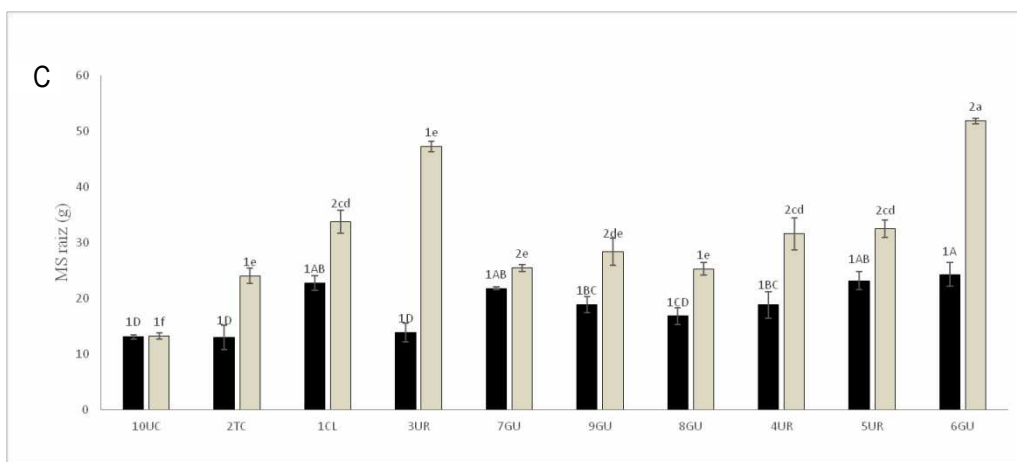
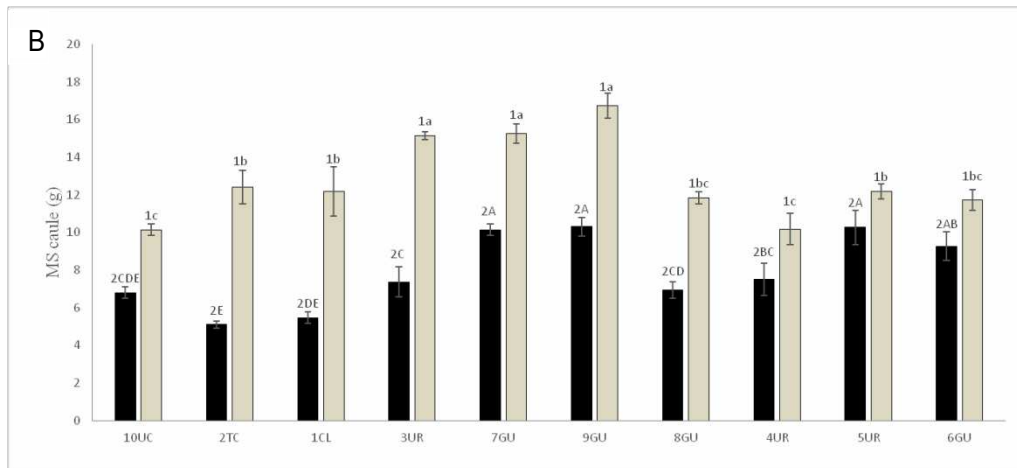
Quanto ao peso seco de caule, todos os clones apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e tiveram redução na produção de peso seco quando submetidos ao déficit hídrico. Sendo que os clones 1 CL, 2 TC, 3 UR, 8 GU e 10 UC produziram em média o dobro de massa seca quando em condição ideal de irrigação. Corroborando com o resultado apresentado por McKiernan et al. (2015) que diz que em todas entre as espécies e procedências testadas por eles, o déficit hídrico diminuiu a biomassa acima do solo.

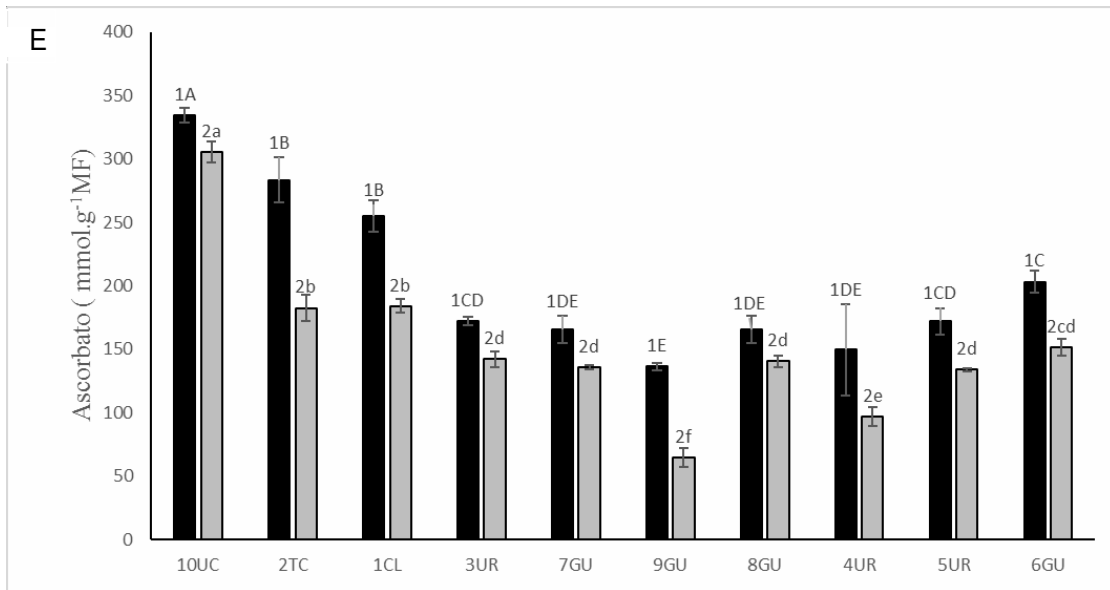
O clone 10 UC foi o único que não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, para peso seco de raiz, o que demonstra que, sob estresse, foi mantida a produção de raiz. Entre os clones que apresentaram diferença entre os tratamentos, pode-se destacar o clone 3 UR, que produziu mais que o dobro de peso seco de raiz quando em condição ideal de irrigação e os clones 2 TC, 4 UR e 6 GU que produziram quase o dobro em condição ideal de irrigação.

O clone 10 TC e o clone 2 TC são considerados tolerantes em campo ao déficit hídrico, sendo que o clone 10 UC foi o único clone que não exibiu diferença estatística entre os tratamentos, mas ambos também foram os que menos produziram nos dois tratamentos, mas mantiveram a produção sob déficit hídrico.

Seis dos dez clones testados apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, sendo que o clone 1 CL e o clone 7 GU obtiveram maior relação raiz/ parte aérea quando submetidos ao déficit hídrico; desses dois clones apenas o 1 CL é considerado tolerante em campo. Os outros dois clones considerados tolerantes entre os testados não apresentaram diferença entre os tratamentos.

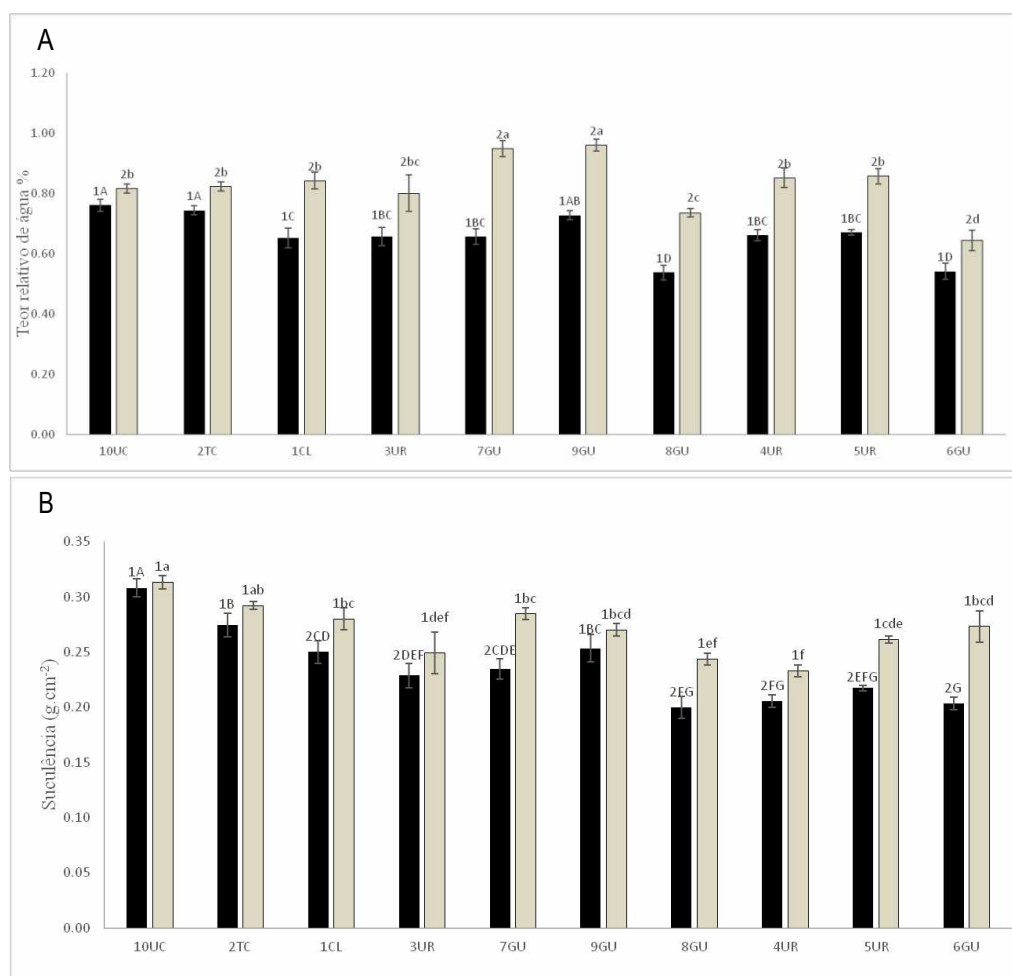






**Figura 2** - Massa seca folhas (g) (A), massa seca caule (g) (B), massa seca raiz (g) (C), massa seca planta (g) (D) e relação raiz/parte aérea (E) em 10 clones de eucalipto: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

Todos os clones apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com relação ao teor relativo de água e todos os clones possuíam maior teor relativo de água quando sob irrigação ideal (Figura 3A). No entanto, os clones 9 GU, 7 GU foram os clones que apresentaram maior diferença entre as situações de irrigação ideal e déficit hídrico. Os resultados para suculência demonstraram maior suculência quando estavam sob condição de irrigação ideal, sendo o clone 10 UC o único que não apresentou diferença estatística para essa variável, mostrando mais uma vez uma estabilidade de comportamento da condição ideal de irrigação para a condição de déficit hídrico. Os clones que apresentaram maior diferença entre os tratamentos foram os 6 GU e 7 GU (Figura 3 B).



**Figura 3** - Teor relativo de água da folha % (A), suculência foliar (g cm<sup>-2</sup>) (B) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey, p < 0,05). As barras representam o desvio padrão da média.

Com relação à taxa fotossintética, existem diferenças significativas entre os clones, mas não existe entre os tratamentos para um mesmo clone (Figura 4A). O clone 0477 obteve maior taxa fotossintética nos dois tratamentos, isso reflete bem o resultado esperado dele por comportamentos em campo, dado que não possui boa desenvoltura sob déficit hídrico, mas sai bem em condições de alagamento. A massa seca total de planta apresentada na Figura 2D confirma essa observação, pois ele foi o clone com maior massa seca para as condições ideais e o terceiro maior para a condição de déficit hídrico. Esse resultado pode ser explicado por ele ser o segundo clone com maior eficiência no uso da água e o primeiro em produção de massa seca de raiz nos dois tratamentos. A taxa fotossintética (Figura 4A) é uma importante variável para descrever

o potencial de crescimento da planta em situação de estresse hídrico, pois se a planta recebe menos água do que transpira, ou perde água a uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, o potencial hídrico da folha diminui, levando ao fechamento dos estômatos, redução da condutância estomática ( $G_s$ ) (Figura 4B) e redução da fotossíntese (Brilli et al. 2013; Gao et al. 2018).

De acordo com o tipo de resposta estomática, as plantas são classificadas como isoídricas ou anisoídricas. As plantas isoídricas são aquelas que fecham seus estômatos quando ocorre queda no potencial hídrico do solo ou aumento na demanda atmosférica. Ao contrário, as plantas anisoídricas não fecham os estômatos e continuam a transpirar mesmo quando o teor de água do solo diminui. Como consequência, o potencial hídrico da folha ( $\Psi_L$ ) diminui, e a planta sofre estresse hídrico. A região de origem do eucalipto, na Austrália, pode estar ligada à seleção natural e, por esse motivo, as espécies que crescem naturalmente em regiões mais áridas na Austrália (Tabela 2), resultam em clones mais tolerantes, assim como observado no presente trabalho, pois podemos classificar como isoídricos os clones 2 TC (*C. torrelliodora*), 10 UC (*E. camaldulense*) e 1 CL (*E. cloeziana*). Existe diferença estatística entre os tratamentos e entre os clones para a variável condutância estomática (Figura 4B), sendo que todos os clones apresentaram maior condutância sob tratamento com irrigação ideal. Os clones 10 UC, 2 TC e 1 CL apresentaram menor condutância estomática e foram considerados tolerantes ao déficit hídrico.

A relação  $F_v/F_m$  é um ótimo indicador de efeito fotoinibitório (Araus e Hogan, 1994), podendo variar em plantas não submetidas a estresses, de 0,75 a 0,85 (Bolhàr-Nordenkamph et al. 1989). O decréscimo ocorrido na ( $F_v/F_m$ ) para as plantas estressadas foi, também, devido à variação ocorrida na fluorescência máxima ( $F_m$ ) e em fluorescência inicial ( $F_0$ ), pois ( $F_v = F_m - F_0$ ). A fluorescência inicial também obteve redução quanto submetida ao déficit hídrico, assim como a  $F_m$ . Não ocorreu diferença significativa entre os clones dentro do tratamento irrigação ideal, mas ocorreram diferenças entre os tratamentos e entre os clones dentro do tratamento deficit hídrico. O único clone que não apresentou diferença entre os tratamentos foi o 10 UC, mas apresentou valores altos, demonstrando não estar estressado em ambos os tratamentos. Os demais clones apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e valores mais baixos, portanto, mais estressados para o tratamento déficit hídrico. De acordo com os resultados apresentados para a variável  $F_v/F_m$ , o clone menos estressado sob déficit hídrico foi o 10 UC e o mais estressado o 8 GU.

A evapotranspiração real (ETR) apresentou diferença entre os tratamentos e entre os clones, porém, os clones 3 UR, 5 UR, 6 GU e o 9GU não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. Ocorreu uma grande diferença na ordenação dos clones quando comparados os ranqueamentos feitos para os dois tratamentos. O clone que mais evapotranspirou sob déficit hídrico foi o 7 GU e o que menos evapotranspirou foi o 2 TC. Em condição de irrigação adequada, o clone que mais evapotranspirou foi o 4 UR e o que menos evapotranspirou foi o 8 GU.

A condutância estomática responde às alterações que ocorrem no ambiente, tais como mudanças na concentração de CO<sub>2</sub>, luminosidade, temperatura do ar, umidade relativa, disponibilidade de água, etc. (Farquhar and Sharkey, 1982; Chaves et al. 2016). A disponibilidade de água no solo afeta a hidratação do mesofilo, de maneira que baixo potencial da água no solo ( $\Psi_{\text{solo}}$ ) pode ocasionar diminuição na hidratação do mesofilo e, conseqüentemente, reduzir *g<sub>s</sub>* (Schulze, 1986; Chaves et al. 2002). Além disso, a água chega ao mesofilo proveniente das raízes para substituir a água perdida para a atmosfera que, dependendo da temperatura do ar e da umidade, pode ter diferentes déficits de pressão de vapor (DPV). O DPV também é um fator que exerce influência em *g<sub>s</sub>* para uma grande variedade de espécies (Lange et al. 1971; Habermann et al. 2003; McAdam and Brodribb, 2015), levando à diminuição em *g<sub>s</sub>* quando as folhas são expostas ao ar seco (DPV elevado) e aumentando *g<sub>s</sub>* quando as folhas são expostas a uma atmosfera com maior umidade relativa do ar (baixo DPV). Ocorreu diferença estatística entre os clones e os tratamentos; os clones que apresentaram diferença entre os tratamentos foram os clones 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR e 9 GU, para todos eles o DPV foi maior no tratamento com déficit hídrico. Os dois clones melhor ranqueados foram os mesmos para os dois tratamentos, 1 CL e 2 TC, e os dois últimos, também foram os mesmos para os dois tratamentos, 9 GU e 6 GU (Figura 4E).

A eficiência instantânea do uso da água (EUA) é calculada dividindo a taxa fotossintética pela transpiração  $EUA = A/E$  e denota a economia de água feita pela planta; por esse motivo, é uma característica importante para a seleção de cultivares tolerantes ao déficit hídrico (Flexas, 2016). Ocorreu diferença estatística entre os tratamentos para todos os clones e diferença estatística entre os clones, sendo que todos eles apresentaram maior eficiência quando submetidos ao déficit hídrico.

Ocorreu diferença estatística entre os tratamentos para todos os clones e entre os clones, sendo que todos os clones transpiraram mais quando irrigados adequadamente do que quando sob déficit hídrico. A ordem do ranqueamento dos clones pouco se

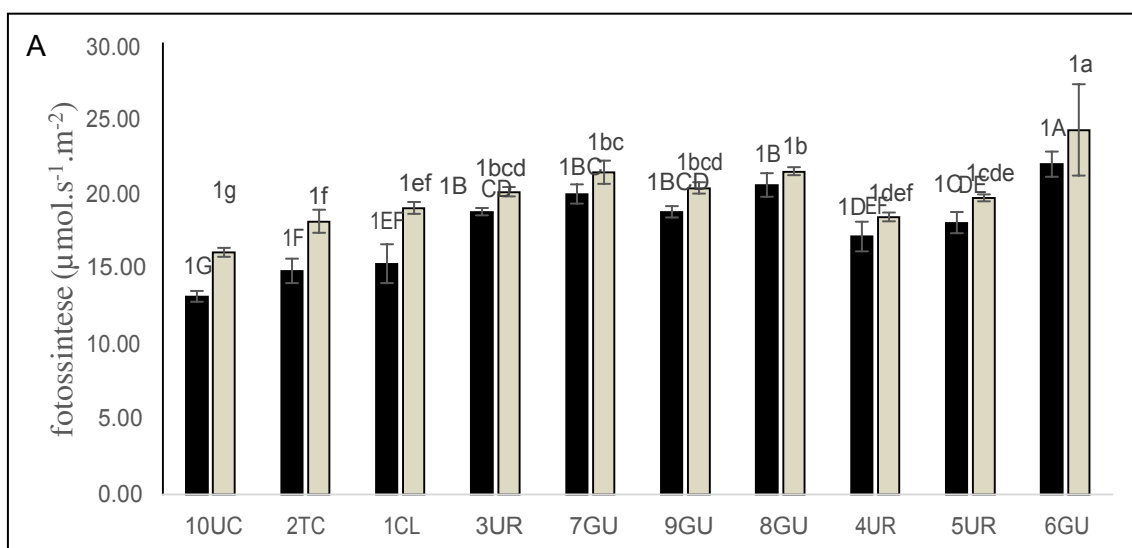
alterou quando comparados os dois tratamentos, com maior transpiração nos clones 4 UR, 7 GU e 8 GU e menor nos clones 2 TC e 10 UC. A transpiração da planta reflete o potencial hídrico, DPV, condutância estomática, taxa fotossintética e potencial produtivo da planta. As plantas com irrigação ideal tiveram maior transpiração, entretanto, clones como 4 UR transpiram muito mesmo sob déficit hídrico. Nesse caso, essa estratégia pode resultar em maior produção em caso de reidratação das plantas, mas a sobrevivência pode ser comprometida, em caso de déficit hídrico continuado. Dentre todos os clones, o 4 UR apresentou o maior grau de estresse considerando a relação  $F_v/F_m$ .

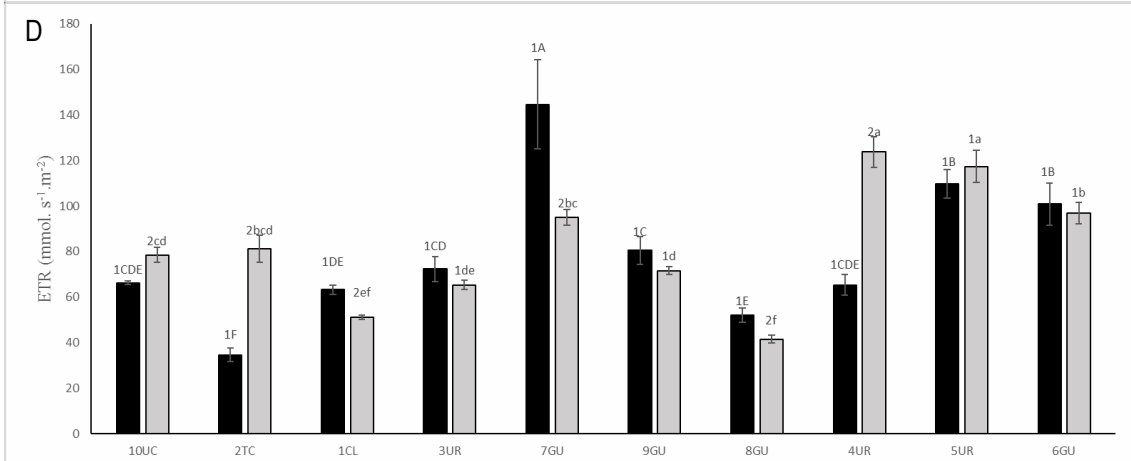
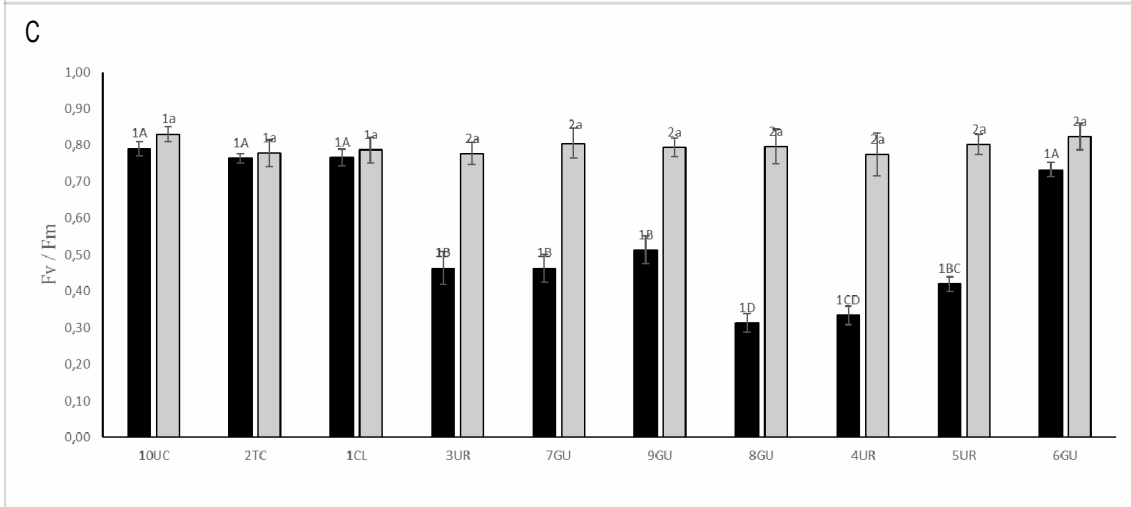
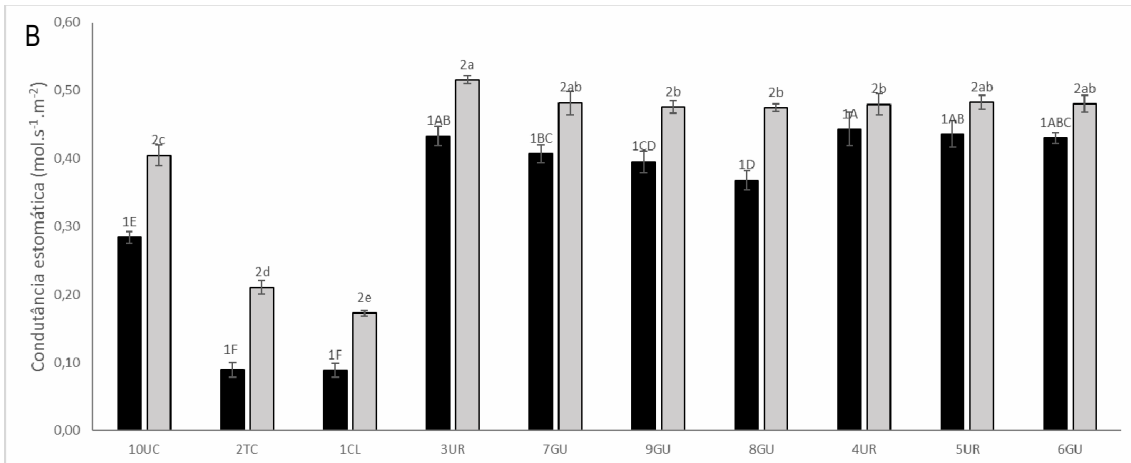
Ocorreu diferença estatística entre os tratamentos e entre os clones para a variável  $C_i/C_a$  (Figura 4H). A relação  $C_i/C_a$ , que é calculada fazendo-se a razão entre carbono interno e carbono externo, foi menor para todos os clones submetidos ao déficit hídrico. Essa alteração é comum em diversas espécies, conforme demonstrado por Albuquerque et al. (2013) em mogno-africano, Teixeira et al. (2015) em eucalipto e Martins et al. (2016) em pequi. Os clones que apresentaram maior valor de  $C_i/C_a$  sob déficit hídrico foram, na seguinte ordem crescente de valores, os clones 8 GU, 1 CL e 10 UC. Sob irrigação ideal a ordem foi 7 GU, 9 GU e 10 UC. Pode-se observar que o clone 10 UC manteve-se na mesma posição no ranqueamento para os dois tratamentos, isso pode significar que ele possui capacidade de manter parte da concentração de  $CO_2$  mesmo quando sob déficit hídrico. Entretanto, os clones que apresentaram baixa relação  $C_i/C_a$ , 6 GU e 5 UR, mantiveram-se na mesma posição do ranqueamento para os dois tratamentos.

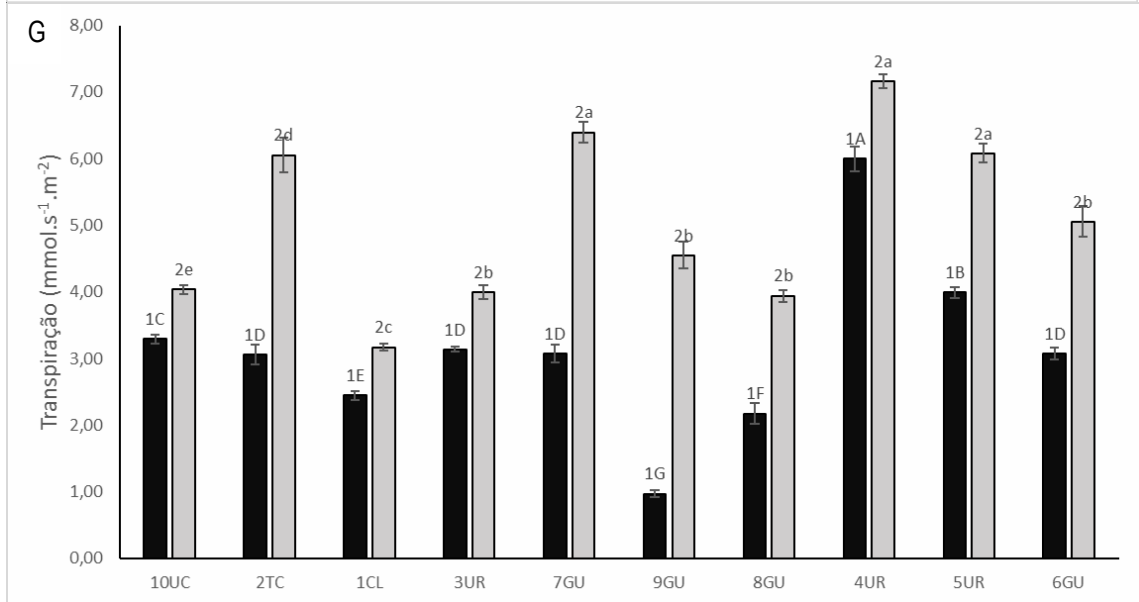
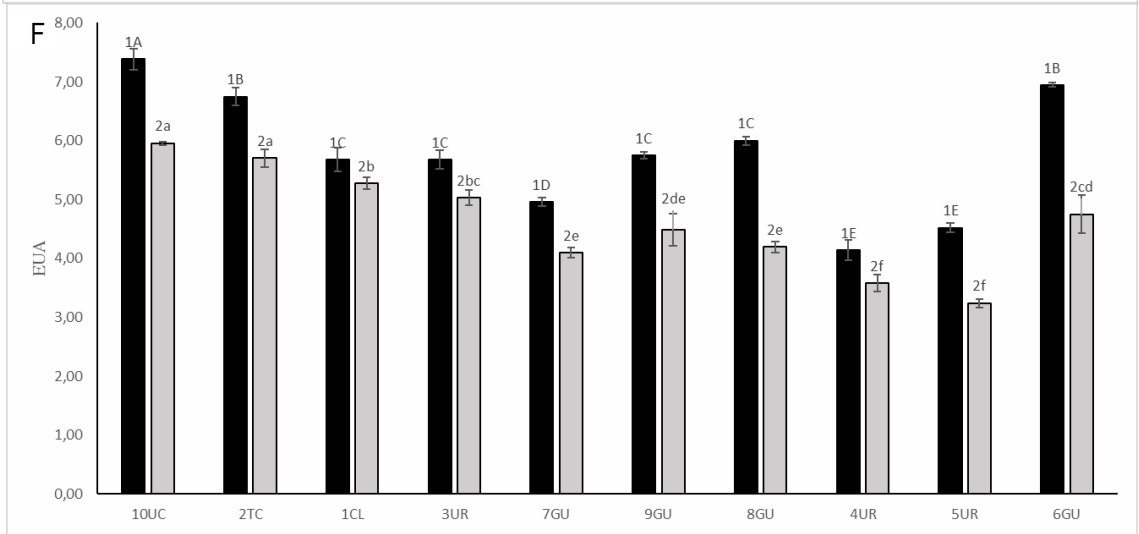
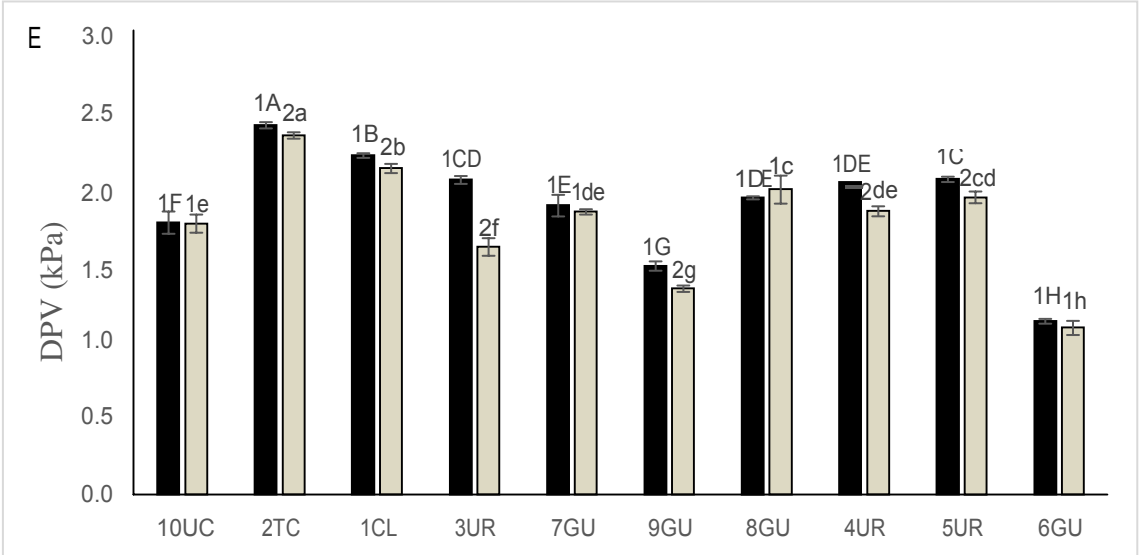
De acordo com Fernandes et al. (2015), o clone mais tolerante ao déficit hídrico é aquele que apresenta a menor redução na fotossíntese líquida. Segundo Hernandez et al. (2016) houve efeito significativo da redução da irrigação sobre a condutância estomática e condução hidráulica específica das folhas de clones de *E. globulus*, mas não houve relação significativa entre as duas variáveis. O fechamento dos estômatos impediu que o potencial hídrico ficasse mais baixo que -1,8MPa. Warren (2008) concluiu que o potencial hídrico do solo possui mais influência sobre a condutância estomática da planta do que o déficit de pressão de vapor, testando em Eucalipto e mais outras duas espécies de plantas. Esse resultado corroborou com os resultados obtidos por Hu et al. (2015), em que a condutância estomática do *C. citriodora* diminuíram de acordo com a redução do teor de água no solo, o que foi confirmado no presente trabalho, em que o clone 2 TC, que possui na sua composição genética o *C. citriodora*,

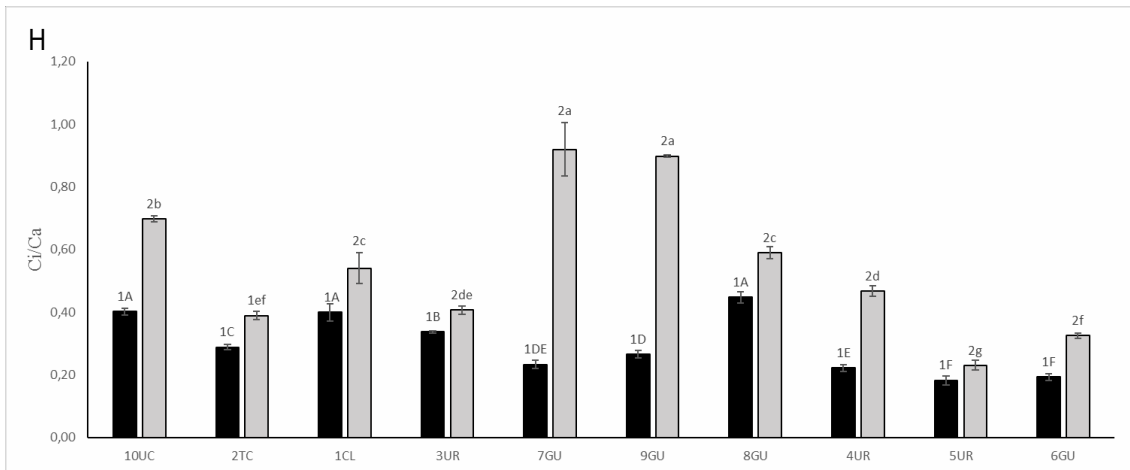
apresentou a maior redução percentual para o valor de condutância estomática da condição ideal de irrigação para a de déficit hídrico.

De acordo com Bourne et al. (2015), o clima de origem influencia diretamente o comportamento estomático entre as espécies de Eucalipto. Espécies originadas de climas mais úmidos tiveram maior uso de água e também maior sensibilidade estomática para déficit de pressão de vapor. Já Gharun et al. (2015) afirmam que espécies com maior e menor uso de água como *Eucalyptus delegatensis* e *Eucalyptus pauciflora*, respectivamente, apresentaram maior capacidade de controle fisiológico de condutância estomática, o que também correspondem aos resultados encontrados, em que os clones 10 UC, 2 TC e 1 CL, considerados tolerantes a déficit hídrico, apresentaram maiores diferenças percentuais nos valores de condutância estomática da condição ideal de irrigação para a de déficit hídrico.









**Figura 4** - Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) (A), condutância estomática ( $\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) (B), Fv/Fm (C), ETR ( $\text{mmol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) (D), DPV KPa(E), EUA (F), transpiração ( $\text{mmol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) (G) e Ci/Ca (H) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

### Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico)

Na Tabela 4 encontram-se os autovetores e a contribuição das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais, bem como a variância explicada por essas variáveis latentes. Observa-se que as duas primeiras componentes principais apresentam os maiores autovalores e explicaram 65% da variância total dos dados.

Analisando a primeira componente principal, observa-se que os maiores autovetores positivos são relativos a peso seco do caule, peso total da planta, fotossíntese, condutância e transpiração. Os autovetores negativos mais significativos referem-se a Incremento % em altura, teor relativo de água, suculência e relação Ci/Ca. Logo, quanto maior for o valor desses componentes (score) uma maior quantidade de variáveis importantes para seleção serão contempladas, uma vez que maiores valores desses scores contribuem para maiores valores de peso seco do caule, peso total da planta, fotossíntese, condutância e transpiração.

Quanto à componente principal 2, observam-se autovetores negativos e significativos apenas referentes às variáveis: relação peso seco da raiz/peso seco parte aérea

e déficit de pressão de vapor. Para o incremento em diâmetro, incremento em altura, peso seco da folha, peso total da planta e suculência, foram obtidos autovetores positivos e com elevada contribuição nessa componente principal. Logo, como valores positivos significativos contemplam maior quantidade de variáveis, maiores valores dos escores dessa componente principal estão diretamente relacionados a maiores valores de incremento em diâmetro, incremento em altura, peso seco da folha, peso total da planta e suculência.

Diante dos autovetores obtidos, pode-se afirmar que as duas primeiras componentes principais reúnem uma grande quantidade de características favoráveis e relevantes para a seleção de clones de eucalipto para a produção em áreas com limitações hídricas. Nota-se que todas as variáveis têm importância significativa em pelo menos um dos dois componentes (CP1 e CP2), sendo que no componente principal 1, os dois maiores valores dos autovetores vem das variáveis transpiração e fotossíntese, e para a componente principal 2, das variáveis incremento em diâmetro e incremento em volume.

A Tabela 5 apresenta a matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

**Tabela 4** - Autovetores nas duas primeiras componentes principais.

Variáveis Originais	Autovetores	
	Componente 1	Componente 2
Incremento em altura	-0,2934	0,0983
Incremento em Diâmetro	0,0344	0,4002
Incremento em volume do caule	-0,0572	0,4124
Peso seco da raiz	0,2376	-0,0928
Peso seco do caule	0,3055	0,1603
Peso seco da folha	0,1106	0,3972
Peso total da planta	0,3044	0,2236
Relação peso seco da raiz / parte aérea	-0,0281	-0,3094
Teor relativo de água (TRA)	-0,2064	0,1223
Suculência	-0,2809	0,2278
Déficit de pressão de vapor (DPV)	-0,1916	-0,2981
Fotossíntese	0,3082	0,0585
Condutância	0,3071	0,0503
Fv/Fm	0,2363	0,1789
Evapotranspiração (ETR)	0,2628	0,1401

Transpiração	0,3131	-0,1701
Ci/Ca	-0,2093	-0,0229
Eficiência do uso de água (EUA)	-0,1997	0,2821
<b>Autovalores</b>	7,74	3,98
<b>Variância explicada</b>	43,00	22,09
<b>Variância explicada acumulada</b>	43,00	65,09

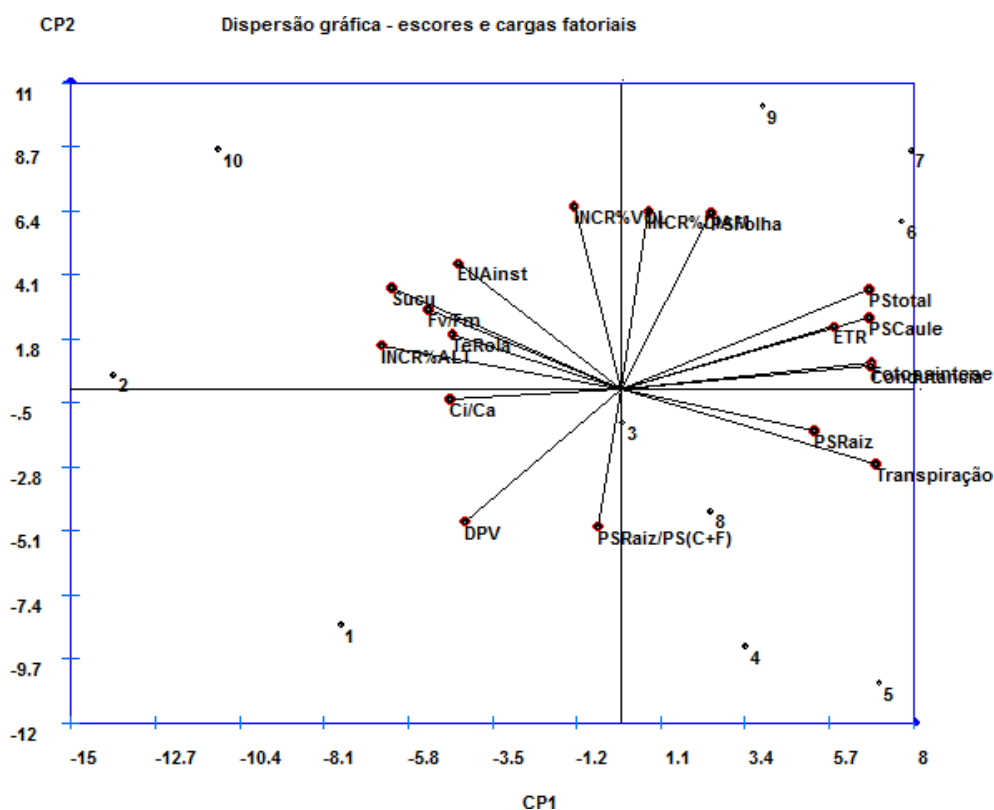
**Tabela 5** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,269								
3	0,248	0,414							
4	0,259	0,850	0,175						
5	0,465	1,207	0,307	0,032					
6	0,986	1,049	0,245	0,583	0,642				
7	1,189	1,152	0,354	0,784	0,854	0,015			
8	0,255	0,617	0,036	0,057	0,133	0,309	0,453		
9	1,089	0,879	0,332	0,879	1,021	0,070	0,040	0,496	
10	0,703	0,169	0,481	1,181	1,542	0,751	0,755	0,774	0,472

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

A dispersão dos clones de eucalipto (considerando dos clones do gênero eucalyptus e corymbia) em função dos escores e diagrama de ordenação dos autovetores das duas primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas pode ser visualizada na Figura 5. Nesse caso, podemos observar nítida separação entre os clones sabidamente tolerantes a déficit hídrico (clone 1, 2 e 10) à esquerda no eixo da CP1 (componente principal 1) e os clones susceptíveis, localizados à direita no eixo da CP1. As variáveis EUA, suculência, Fv/Fm, TRA, incremento em altura, Ci/Ca e DPV foram as mais relevantes no agrupamento desses três clones considerados tolerantes.

A proximidade no gráfico da Figura 5 e o baixo valor de dissimilaridade na Tabela 5 (0,015) dos clones 6 e 7, indica similaridade de comportamento entre os mesmos, sendo que neste caso as variáveis de maior relevância para este agrupamento são o peso seco da folha, incremento em diâmetro, peso seco caule e peso seco total.



**Figura 5** - Dispersão dos clones e das variáveis avaliadas em função dos escores e autovetores respectivamente das duas primeiras componentes principais.

Como sabemos por observação de campo, que os clones 1, 2 e 10 são tolerantes ao déficit hídrico, e o gráfico mostra um distanciamento entre os mesmos quando se avalia no eixo da CP2 (componente principal 2), pode-se inferir sobre a possibilidade de cada um deles estar utilizando diferentes mecanismos de resistência, que no caso em estudo indicaria que, para o clone 10, a variável de maior relevância para esta tolerância seria EUA, para o clone 2 relação Ci/Ca e incremento em altura, e para o clone 1 DPV.

## **Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico)**

A análise de variáveis canônicas foi utilizada, também, por ser um procedimento estatístico multivariado eficiente para avaliação do grau de similaridade entre os materiais genéticos em estudo (clones de eucalipto).

O objetivo principal dessa análise é proporcionar a simplificação estrutural dos dados, de forma que a divergência genética, influenciada, em princípio, por um conjunto com muitas variáveis, possa ser avaliada por um conjunto com poucas variáveis (variáveis canônicas), que são combinações lineares do conjunto maior, não correlacionadas e que possibilita uma avaliação gráfica bi ou tridimensional de fácil interpretação. Essas variáveis canônicas são também denominadas de super variáveis, por representarem mais de uma variável original de grande importância na explicação da diversidade entre os clones.

Na Tabela 6 encontram-se as estatísticas utilizadas na avaliação das nove variáveis canônicas, quando se comparou as 9 variáveis consideradas mais importantes desconsiderando as variáveis redundante, removendo assim incremento em altura e incremento em diâmetro, ficando somente com incremento em volume, que é um combinação das duas anteriores; peso seco da raiz, peso seco da folha e peso seco do caule para ficar somente com a relação raiz/ parte aérea; removendo suculência e ficando com TRA; removendo fotossíntese e transpiração e ficando somente com EUA. Para esta análise, a remoção de variáveis redundantes é importante para evitar o efeito de multicolinearidade.

Observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas foram estatisticamente significativas, explicaram mais de 86% da variância total dos dados e apresentam elevado  $R^2$  canônico. Logo, as informações mais relevantes dos dados originais estão contidas nessas duas variáveis canônicas.

**Tabela 6** - Estatísticas utilizadas na avaliação das seis primeiras variáveis canônicas.

<b>Variável canônica</b>	<b>R<sup>2</sup> canônico</b>	<b>Autovalor</b>	<b>F aproximado</b>	<b>NS</b>	<b>VARE</b>	<b>VAREA</b>
1	0,875	673,35	8,31	0,001	73,15	73,15
2	0,822	124,69	6,71	0,001	13,54	86,69
3	0,643	55,23	5,02	0,001	6,00	92,69
4	0,541	39,42	6,12	0,001	4,28	96,97
5	0,521	14,88	7,41	0,001	1,62	98,59
6	0,482	7,23	7,14	0,01	0,79	99,37
7	0,431	4,68	6,25	0,05	0,51	99,88
8	0,401	0,97	4,12	0,05	0,11	99,99
9	0,312	0,11	4,47	0,05	0,01	100,00

NS: Nível de Significância; VARE: Variância explicada (%); VAREA: Variância explicada acumulada (%)

Na Tabela 7 encontram-se os valores dos autovetores das duas primeiras variáveis canônicas, bem como a variância explicada por essas variáveis. Observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas principais apresentam os maiores autovalores e explicaram 86,70% da variância total dos dados.

Diante dos autovetores obtidos, pode-se afirmar que as duas primeiras variáveis canônicas reúnem características favoráveis e mais relevantes para a seleção de clones de eucalipto para a produção em áreas com limitações hídricas. Nota-se, ainda, que a variável incremento caule e ETR apresentaram autovetores menos expressivos para as variáveis canônicas 1 e 2. Dessa forma, essas variáveis podem ser consideradas de baixa relevância no processo de agrupamento dos clones tendo como base as duas primeiras variáveis canônicas analisadas. Em relação aos resultados obtidos na avaliação das componentes principais, encontramos uma concordância relacionada à baixa expressividade da variável ETR, porém, com relação à variável incremento em caule, os resultados foram contraditórios, uma vez que para a componente principal 2 teve significativa influência.

Condutância e TRA, assim como na análise de componentes principais, para as duas primeiras variáveis canônicas apresentaram valores significativos. Esse fato reforça a importância destas duas variáveis no agrupamento e seleção de clones de eucalipto para tolerância ao déficit hídrico.

O DPV apresentou valores significativos para a variável canônica 1 e variável canônica 2. Apesar desse resultado não ser similar àquele observado pela análise de componentes principais, esta variável tem grande importância na seleção de material genético para tolerância a déficit hídrico, como relatado por diversos autores, em

eucalipto. E devido a esta variável ter contribuído significativamente para separação dos grupos de tolerantes e susceptíveis à deficiência hídrica, a metodologia de análise por variáveis canônicas com exclusão de variáveis redundantes se mostra mais eficiente que análise por componentes principais com todas as variáveis presentes.

**Tabela 7** - Autovetores nas duas primeiras Variáveis canônicas.

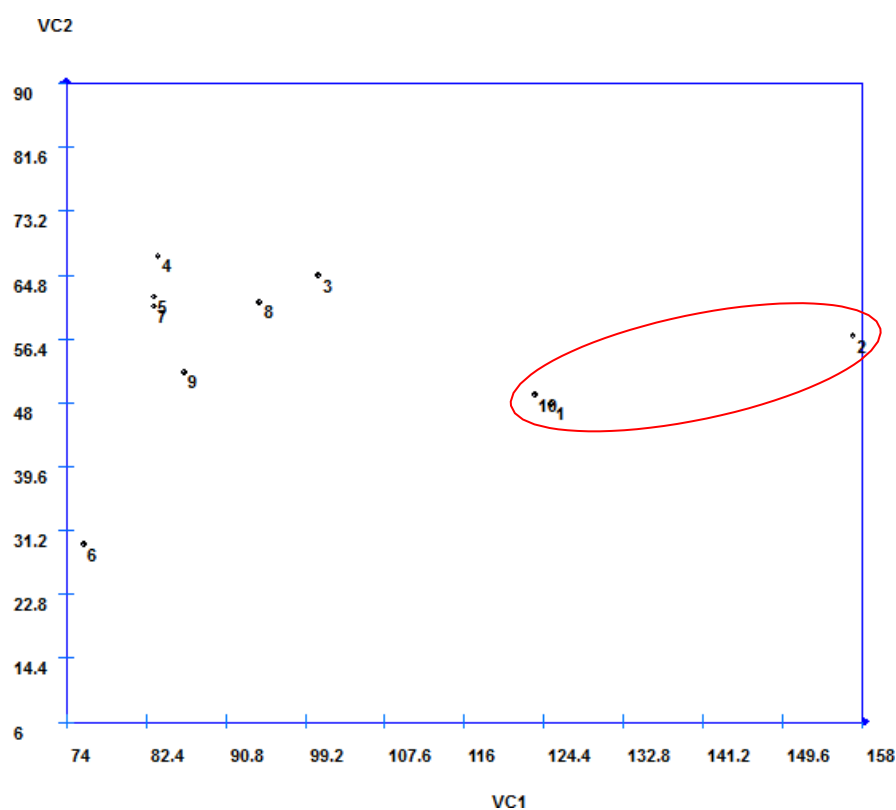
Variáveis Originais	Autovetores	
	Variável Canônica 1	Variável Canônica 2
Incremento % em volume do caule (INVOCA)	0,0022	0,0057
Relação Peso seco da Raiz / Peso seco C + F (RRPA)	-7,5808	-2,4754
Teor relativo de água (TRA)	25,6236	28,4244
Déficit de pressão de vapor (DPV)	37,0274	23,2642
Condutância (COND)	-63,6671	34,8944
Nível de estresse pela relação Fv/Fm (Fv/Fm)	26,0677	-22,4944
Evapotranspiração (ETR)	-0,1182	-0,0268
Relação CO2 interno e CO2 externo pelo (Ci/Ca)	-14,3605	15,1755
Eficiência de utilização de água instantâneo (EUA)	7,2409	-1,5655
<b>Autovalores</b>	<b>673,359</b>	<b>124,689</b>
<b>Variância explicada</b>	<b>73,15</b>	<b>13,55</b>
<b>Variância explicada acumulada</b>	<b>73,15</b>	<b>86,70</b>

Para auxiliar a formação e separação de grupos similares de clones, com base nos escores referentes às duas primeiras variáveis canônicas, também foi determinada a matriz de dissimilaridade entre os clones considerando a distância euclidiana quadrática, (Tabela 8).

**Tabela 8** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,2078								
3	0,2879	0,5266							
4	0,5236	0,8935	0,0483						
5	0,4030	0,8437	0,0511	0,0205					
6	0,6081	1,5199	0,9598	1,0094	0,7428				
7	0,3804	0,8368	0,0573	0,0309	0,0011	0,6876			
8	0,2666	0,6084	0,0144	0,0436	0,0192	0,7553	0,0192		
9	0,2400	0,7715	0,1423	0,1639	0,0693	0,3729	0,0534	0,0681	
10	0,0014	0,2119	0,2486	0,4709	0,3589	0,6131	0,3384	0,2298	0,2138

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)



**Figura 6** - Dispersão dos clones em função dos escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Assim como foi constatado para componentes principais, avaliando a Figura 6 podemos novamente observar uma nítida separação entre os clones sabidamente tolerantes a déficit hídrico (clone 1, 2 e 10) à direita no eixo da VC1 (variável canônica 1) e o clone 6, mais susceptível, localizados à esquerda no eixo da VC1, sendo as variáveis condutância, DPV e TRA as mais relevantes no agrupamento desses três clones considerados tolerantes.

A proximidade no gráfico da Figura 6 e o baixo valor de dissimilaridade na tabela 8 (0,0014) entre os clones 1 e 10, indica similaridade de comportamento entre os mesmos, sendo que neste caso as variáveis de maior relevância para este agrupamento são novamente condutância, DPV e TRA.

### **Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico)**

Na Tabela 9, estão apresentados, para a condição de crescimento sob déficit hídrico, os coeficientes de correlação entre as variáveis originais de crescimento das

mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis de crescimento, bem como a correlação entre as variáveis originais das características fisiológicas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis fisiológicas das plantas. Com base nos pares canônicos apresentados na Tabela 9, observou-se predomínio das variáveis TRA e suculência, entre as variáveis que compõem o primeiro para canônico do grupo 1 (características de crescimento). Para as variáveis que compõem o grupo 2 (características fisiológicas), nenhuma variável teve correlação significativa.

No segundo par canônico, houve predomínio da variável peso seco da raiz no grupo 1, e ETR e relação  $C_i/C_a$  para o grupo 2.

No terceiro par canônico, houve maior concentração de variáveis com correlações significativas, tanto para o grupo 1 quanto para o grupo 2, sendo que para o grupo 1 obteve-se significância no resultado da correlação para as características incremento em altura, peso seco caule, suculência, TRA e peso seco de folha respectivamente em ordem decrescente de valor de correlação. E para o grupo 2, as características fotossíntese, condutância, transpiração, DPV, relação FV/FM e ETR respectivamente em ordem decrescente para o valor de correlação.

No quarto par canônico, houve alta correlação apenas para a variável peso seco raiz, do grupo 1.

No quinto par canônico, não foi encontrado nenhuma correlação significativa.

No sexto para canônico, houve alta correlação apenas para a variável FV/FM, do grupo 2.

**Tabela 9** - Correlação entre as variáveis originais de crescimento das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis de crescimento das mudas (Ui).

Variável	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
<b>Grupo 1</b>							
INALT	-0.038	0.168	<u>-0.807</u>	-0.144	0.006	-0.286	0.465
INDIAM	0.291	0.022	0.271	0.472	0.546	-0.206	<u>0.528</u>
PSR	-0.193	<u>0.537</u>	0.415	<u>0.582</u>	-0.102	0.173	-0.351
PSC	0.402	0.466	<u>0.773</u>	0.010	-0.099	0.039	-0.112
PSF	0.403	-0.104	<u>0.563</u>	-0.178	-0.039	-0.350	<u>0.596</u>
TRA	<u>0.661</u>	0.182	<u>-0.624</u>	-0.243	-0.164	0.006	0.234
SCU	<u>0.592</u>	-0.047	<u>-0.691</u>	0.025	0.092	-0.359	0.180
Variável	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
<b>Grupo 2</b>							
DPV	-0.141	-0.106	<u>-0.666</u>	-0.283	0.055	0.465	-0.105
FOT	-0.327	0.106	<u>0.919</u>	0.056	0.082	-0.025	0.124
COND	0.120	0.053	<u>0.863</u>	-0.293	-0.207	0.071	-0.276
Fv/Fm	0.013	0.199	<u>-0.616</u>	0.328	0.064	<u>-0.663</u>	0.118
ETR	0.253	<u>0.571</u>	<u>0.585</u>	0.205	0.066	-0.048	-0.411
TRAN	-0.152	0.271	<u>0.678</u>	-0.084	-0.148	<u>0.595</u>	-0.212
Ci/Ca	0.040	<u>-0.874</u>	-0.336	0.221	0.152	-0.089	0.028
EUA	0.036	-0.256	-0.265	0.074	0.307	<u>-0.807</u>	0.267

Valores sublinhados referem-se a correlações significativas a 5% e representam as variáveis que predominaram na explicação da variância total. INALT, incremento percentual em altura do início do tratamento até medição, INDIAM, incremento percentual em diâmetro, PSR, peso seco da raiz, PSC, peso seco do caule, PSF, peso seco da folha, TRA, teor relativo de água, SCU, suculência, DPV, déficit de pressão de vapor, FOT, fotossíntese, COND, condutância estomática, Fv/Fm, relação Fv/Fm, ETR, Evapotranspiração, TRAN, Transpiração da folha, Ci/Ca, relação , e EUA, eficiência de utilização da água instantânea.

No sétimo par canônico, houve alta correlação para as variáveis peso seco da folha e incremento em diâmetro respectivamente no grupo 1 de variáveis, e nenhuma variável apresentou correlação significativa no grupo 2 para este par canônico.

### **Análise de Correlações Canônicas (Irrigação Ideal)**

Na Tabela 10 estão apresentados, para a condição de crescimento em ambiente com disponibilidade de água ideal, os coeficientes de correlação entre as variáveis originais de crescimento das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis de crescimento, bem como a correlação entre as variáveis originais das características fisiológicas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis fisiológicas das plantas. Com base nos pares canônicos apresentados na Tabela 4, observou-se para o primeiro par canônico (U1,V1) do grupo 1, que somente a

variável PSFolha, apresentou valor significativo. Para as variáveis que compõem o grupo 2 (características fisiológicas), somente a variável  $C_i/C_a$  teve uma correlação significativa.

No segundo par canônico, as variáveis que apresentaram correlações significativas para o grupo 1, em ordem decrescente de valor de correlação, foram peso seco raiz, TRA e incremento em diâmetro, e para o grupo 2 para este mesmo par canônico foram as variáveis fotossíntese e transpiração.

No terceiro par canônico, houve a maior concentração de variáveis com correlações significativas para o grupo 2, sendo que para o grupo 1 obteve-se significância no resultado da correlação para as características, e peso seco de raiz e incremento em altura respectivamente em ordem decrescente de valor de correlação. E para o grupo 2, as características transpiração, fotossíntese, EUA, DPV e condutância respectivamente em ordem decrescente para o valor de correlação.

No quarto par canônico houve correlação significativa apenas para a variável suculência no grupo 1 e EUA e transpiração no grupo 2.

No quinto par canônico houve correlação significativa apenas para a variável Sucu no grupo 1 e  $F_v/F_m$  e transpiração no grupo 2.

No sexto par canônico houve alta correlação apenas para a variável peso seco caule, do grupo 1.

No sétimo par canônico não houve nenhuma correção significativa.

Os resultados apresentados na Tabela 6 confirmam a importância das características incremento em altura e peso seco folha para o grupo 1 avaliado, e transpiração e fotossíntese para o grupo 2, características estas fortemente correlacionadas com produtividade da planta em condições ideais de crescimento.

**Tabela 10** - Correlação entre as variáveis originais fisiológicas das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis fisiológicas das mudas (U<sub>i</sub>, V<sub>i</sub>).

Variável	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
<b>Grupo 1</b>							
INALT	-0.168	-0.201	<u>-0.882</u>	0.377	0.060	-0.010	0.081
INDIAM	0.465	<u>0.503</u>	0.297	-0.038	-0.283	0.444	-0.405
PSR	-0.261	<u>-0.599</u>	<u>0.560</u>	0.136	0.278	0.041	0.403
PSC	0.467	-0.349	-0.030	-0.381	0.110	<u>0.645</u>	0.293
PSF	<u>0.881</u>	-0.234	0.351	-0.093	0.001	0.143	0.131
TRA	0.326	<u>0.531</u>	-0.310	-0.486	0.174	0.428	0.257
SUCU	0.356	0.319	-0.298	<u>0.593</u>	<u>-0.518</u>	0.226	0.114
Variável	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
<b>Grupo 2</b>							
DPV	-0.326	0.294	<u>-0.625</u>	-0.183	-0.156	-0.136	-0.091
FOT	0.181	<u>-0.576</u>	<u>0.721</u>	-0.193	-0.179	-0.010	0.185
COND	0.405	-0.143	<u>0.557</u>	-0.241	0.429	-0.074	-0.448
Fv/Fm	0.368	0.160	0.393	0.432	<u>-0.540</u>	-0.081	-0.304
ETR	0.059	<u>0.595</u>	<u>0.543</u>	0.174	<u>0.502</u>	-0.070	0.060
TRAN	-0.025	0.038	<u>0.789</u>	<u>-0.543</u>	0.131	-0.030	-0.133
Ci/Ca	<u>0.712</u>	0.160	-0.299	-0.400	-0.235	0.060	0.170
EUA	0.090	-0.218	<u>-0.627</u>	<u>0.650</u>	-0.276	0.054	0.150

Valores sublinhados referem-se a correlações significativas a 5% e representam as variáveis que predominaram na explicação da variância total. INALT, incremento percentual em altura do início do tratamento até medição, INDIAM, incremento percentual em diâmetro, PSR, peso seco da raiz, PSC, peso seco do caule, PSF, peso seco da folha, TRA, teor relativo de água, SCU, suculência, DPV, déficit de pressão de vapor, FOT, fotossíntese, COND, condutância estomática, Fv/Fm, relação Fv/Fm, ETR, Evapotranspiração, TRAN, Transpiração da folha, Ci/Ca, relação , e EUA, eficiência de utilização da água instantânea.

## CONCLUSÕES

Os clones sabidamente tolerantes têm relação direta com as variáveis incremento em altura, suculência e relação  $F_v/F_m$ , e relação inversa com as variáveis massa seca do caule, massa seca da planta, fotossíntese e condutância, quando se avalia os gráficos de médias.

As ferramentas estatísticas de análise de componentes principais e variáveis canônicas atendem perfeitamente ao objetivo do trabalho, que é separar os clones tolerantes dos suscetíveis utilizando as variáveis em questão.

A análise de correlações canônicas confirma a importância das variáveis incremento em altura, suculência, relação  $F_v/F_m$ , massa seca do caule, massa seca da planta, fotossíntese e condutância, para seleção de material genético em ambiente com déficit hídrico. E o par canônico número 3 ( $U_3, V_3$ ), foi o que melhor representou esta realação entre a variáveis.

Foi observado que os clones considerados tolerantes têm comportamento isoídrico devido à significativa redução na condutância estomática sob condição de déficit hídrico, além de apresentar os menores valores para essa característica. No entanto, esses clones tolerantes apresentam os maiores incrementos em altura e suculência, mesmo apresentando os menores valores de fotossíntese e massa seca da planta.

## Referências

- Associação Baiana das Empresas de Base Florestal. Relatório ABAF 2017. Salvador, 2017. 2-26p
- Albuquerque MPF, Moraes FKC, Santos RIN, Castro GLS, Ramos EMLS, Pinheiro HA (2013) Ecofisiologia de plantas jovens de mogno africano submetidas a déficit hídrico e reidratação 48:9-16
- Araus JL, Hogan KP (1994) Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms. *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearing and forest understory during the dry season in Panama. *American Journal of Botany* 81:726-738
- Bolhàr-Nordenkamph HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514
- Bourne AE, Haigh AM, Ellsworth DS (2015) Stomatal sensitivity to vapour pressure deficit relates to climate of origin in *Eucalyptus* species. *Tree Physiology* 35:266-278
- Brilli F, Tsonev T, Mahmood T, Velikova V, Loreto F, Centritto M (2013) Research paper Ultradian variation of isoprene emission, photosynthesis, mesophyll conductance, and optimum temperature sensitivity for isoprene emission in water-stressed *Eucalyptus citriodora* saplings 64:519-528
- Cassel DK, Nielsen DR (1986) Field capacity and available water capacity. In: KLUTTE A. *Methods of soil analysis*. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2.ed. Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of Agronomy, 901-926
- Catsky J (1974) Water saturation deficit (relative water content). In: Slavik B (Ed.) *Methods of studying plant water relations*. Springer-Verlag, Berlin. p.136-154
- Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, Pinheiro C, Lopes CM, Pereira JS (2016) Cotrolling stomatal aperture in semi-arid regions – The dilemma of saving water or being cool? *Plant Science* 251:54-64
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103: 551–560
- Chaves MM, JP Maroco, JS Pereira (2003) Understanding plant responses to drought- from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89:907-916

Christina M, Maire GL, Battie-Laclau P, Nouvellon Y, Bouillet JP, Jourdan C, Gonc JLM, Laclau AJP (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *Global Change Biology* 21:2022–2039

Cruz CD (2013) GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:271-276

Dos Santos EA, Almeida A-AFd, Ahnert D, Branco MCdS, Valle RR, Baligar VC (2016) Diallel Analysis and Growth Parameters as Selection Tools for Drought Tolerance in Young *Theobroma cacao* Plants. *PLoS ONE* 11:21-25

Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33:317-345

Fernandes ET, Cairo PAR, Novaes AB (2015) Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. *Ciência Florestal* 45:29-34

Ferreira EVO, Novais RF, Pereira GL, Nairam FB, Silva IR (2015) Differential Behavior of Young *Eucalyptus* Clones in Response to Nitrogen Supply. *Revista Brasileira Ciência do Solo* 39:809-820

Fita A, Rodríguez-Burruezo A, Boscaiu M, Prohens J, Vicente O (2015) Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: A new paradigm for increasing food production. *Front Plant Sci* 6:978

Flexas J (2016) Genetic improvement of leaf photosynthesis and intrinsic water use

Gao Z, Shen W, Chen G (2018) C4-like photosynthesis has important functions in C3 plant vasculature. *Journal of Experimental Botany* 155

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of

Gharun M, Turnbull TL, Pfautsch S, Adams MA (2015) Stomatal structure and physiology do not explain differences in water use among montane eucalypts. *Physiological Ecology*

Habermann G, Machado EC, Rodrigues JD, Medina C (2003) Gas exchange rates at different vapor pressure deficits and water relations of 'Pera' sweet orange plants with Citrus Variegated Chlorosis (CVC). *Scientia Horticulturae* 98:233-245

Hernandez MJ, Montes F, Ruiz F, Lopez G, Pita P (2016) The effect of vapour pressure deficit on stomatal conductance, sap pH and leaf-specific hydraulic conductance in *Eucalyptus globulus* clones grown under two watering regimes. *Annals of Botany* 117: 1063-1071

Hu YT, Zhao P, Niu JF, Sun ZW, Zhu LW (2015) Characteristics of canopy stomatal conductance in plantations of three re-vegetation tree species and its sensitivity to environmental factors. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 26:2623-2631

Iizumi T, Ramankutty N (2015) How do weather and climate cropping area and intensity? *Glob Food Sec* 4: 46-50

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório 2017. São Paulo, 2017. 2-77p.

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ (2009) Somasundaram, R., Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal Agricultural Biology* 11:100-105

Lange OL, Lösch R, Schultze ED, Kappen L (1971) Responses of stomata to changes in humidity. *Planta* 100:76-86

Lauteri M, Haworth M, Serraj R, Monteverdi MC, Centritto M (2014) Photosynthetic diffusional constraints affect yield in drought stressed rice cultivars during flowering. *Plos One* 9: e109054

Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature* 7;529 (7584): 84-7

Martins DA, Jakelaitis A, Costa AC, Almeida GMA, Silva Filho RO (2016) Weeds interference in pequi plants. *Plantas daninhas* 36:0-8

McAdam SAM, Brodribb TJ (2015) The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapour pressure deficit. *Plant Physiology* 167:833-843

McKiernan AB, Potts BM, Brodribb TJ, Hovenden MJ, Davies NW, McAdam SAM, Ross JJ, Rodemann Thomas, O'Reilly-Wapstra JM (2015) Responses to mild water deficit and rewatering differ among secondary metabolites but are similar among provenances within *Eucalyptus* species. *Tree Physiology* 0:1-15

McKiernan AB, Potts BM, Hovenden MJ, Brodribb TJ, Davies NW, Rodemann T, McAdam SAM, O'Reilly-Wapstra JM (2017) A water availability gradient reveals the deficit level required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. *Annals of Botany* 119:1043-1052

MINGOTI, S. A. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. 295 p. (Didática)

Schulze ED (1986) Carbon dioxide and water vapour exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annual Review of Plant Physiology* 37:247-274

Shvaleva AL, Costa F, Silva E, Breia E, Jouve L, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM (2005) Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity *Tree Physiology* 26:239-248

Silveira JAG, Araújo SAM, Lima JPMS, Viégas RA (2009) Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex numularia*. *Environ Exp Bot* 66: 1–8

Stape JL (2002) Production ecology of clonal Eucalypto plantation in northeastern Brazil. Thesis (Ph.D)-Colorado State University, fort Collins. 225p

Stape JL, Binkley D, Ryan MG (2008) Production and carbon allocation in a clonal Eucalyptus plantation with water and nutrient manipulations. *Forest Ecology and Management* 255, 920-930

Tardieu F, Granier C, Muller B (2011) Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator ? *Curr Opin Plant Biol* 14:283-289

Teixeira, P. C., Gonçalves J. L. M., Junior, J. C. A. (2015) Crescimento e partição de matéria seca de mudas de eucalipto em função da adubação potássica e água do solo/growth and dry matter partition of seedlings of eucalyptus in response to potassium fertilization and soil water." *Ceres* 53.310

## CAPÍTULO 2

### **Influência do metabolismo enzimático antioxidante em clones de eucalipto na tolerância ao déficit hídrico**

#### **Introdução**

A eucaliptocultura no Brasil possui 7,84 milhões de hectares de reflorestamento, sendo que 91% de toda madeira produzida para fins industriais é de responsabilidade do setor brasileiro de árvores e corresponde a 6,2% do PIB Industrial do país (IBA 2017).

O uso do Eucalipto, diferentemente de outras espécies florestais, ocorre devido à sua grande adaptabilidade aos diversos ambientes edafoclimáticos do país, pelo seu crescimento rápido e ao melhoramento genético alcançado para a espécie.

Nas últimas décadas, ocorreu aumento da demanda de madeira e produtos derivados da mesma, como: carvão, energia, papel e celulose, o que elevou à necessidade de aumento de produtividade e aumento de áreas usadas para a produção de eucalipto.

Todavia, as áreas mais produtivas já estavam sendo exploradas nas regiões sudeste do país e novas áreas, nas regiões nordeste e norte, passaram a ser exploradas. Essas regiões, no entanto, possuem características diferentes das exploradas anteriormente, apresentando diferentes tipos de solos, variações da época de chuva e elevadas temperaturas. Dessa maneira, alguns materiais selecionados em outras regiões não foram economicamente produtivos nas novas regiões, demonstrando a importância de programas de melhoramento específicos para essas novas regiões e estudos para compreender melhor a relação entre o eucalipto e as condições ambientais, como a escassez de água em determinados períodos.

Potencializando as características das novas áreas produtivas às variações climáticas globais e aos eventos climáticos extremos, como secas severas e chuvas, as áreas produtivas ficaram expostas a estresses hídricos, sendo esse o problema mais impactante na produtividade (Iizumi e Ramankutty, 2015; Lesk et al. 2016).

Um dos principais efeitos da restrição hídrica sobre as plantas é a redução do processo fotossintético e, conseqüentemente, do crescimento, devido ao menor alongamento das células da folha e do caule (Jaleel et al. 2009). A eficiência do processo fotossintético depende, dentre outros fatores, dos pigmentos cloroplastídicos,

cujas concentrações podem ser alteradas em resposta ao déficit hídrico (Farooq et al. 2009). Os pigmentos são importantes para manter a eficiência fotossintética e também podem contribuir para maior tolerância ao déficit hídrico em diferentes espécies de plantas (Abbasi et al. 2014; Khoyardi et al. 2016; Mibei et al. 2017).

A reduzida eficiência fotossintética associada à seca pode induzir o estresse oxidativo nas plantas devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas são altamente reativas e causam danos às membranas (peroxidação de lipídios), ao DNA, proteínas e inibição enzimática (Miller et al. 2010). Por essas razões, seus níveis na planta são regulados por mecanismos de defesa antioxidantes, que pode ser enzimático e/ou não enzimático (DaCosta e Huang, 2007). O sistema de defesa antioxidativo enzimático compreende várias enzimas; dentre as principais, tem-se a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases totais (POXs), a peroxidase do ascorbato (APX), a redutase da glutatona (GR) e a peroxidase da glutatona (GPX) (Huang et al. 2013), as quais operam em diferentes compartimentos subcelulares, em ação conjunta contra o estresse oxidativo (Sharma, 2012).

Além dos mecanismos antioxidantes enzimáticos, compostos como a glutatona (GSH) e o ascorbato (Asc) atuam como antioxidantes, os quais apresentam taxa biossintética estimulada em resposta ao estresse, promovendo aumento na capacidade de defesa da célula (Koffler et al. 2013). A GSH e Asc estão localizados em diferentes compartimentos celulares como citosol, retículo endoplasmático, vacúolo, mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomas, bem como no apoplasto, o que favorece a atuação desses metabólitos na defesa intracelular contra danos oxidativos induzidos pelas EROS (Koffler et al. 2014). A peroxidação lipídica das membranas celulares induzidas pelas EROS resulta na formação de hidroperóxidos de lipídeos, um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, pois reduz a fluidez, a permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (Queiroz et al. 1998).

O presente estudo buscou analisar as alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo antioxidante em 10 clones de eucalipto, selecionados em áreas diferentes do Brasil, e compará-los quanto ao nível de estresse e reação ao déficit hídrico.

## Materiais e métodos

### Material vegetal

Dez clones comerciais, sendo cinco selecionados na região Nordeste de Minas Gerais (1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR) e cinco selecionados na região Norte da Bahia (6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC) (Tabela 1), os quais foram obtidos a partir do cruzamento das espécies representadas na Tabela 2. As mudas desses clones foram selecionadas visualmente quanto à uniformidade de desenvolvimento e sanidade, após foram cultivadas em vasos plásticos, cobertos por saco plástico para impermeabilizar o vaso, com volume de cinco litros contendo solo peneirado de textura média (Tabela 2) e adubado com 10 g de Osmocote® de formulação NPK 19-6-10, com 3 repetições, e mantidos em viveiro de mudas coberto do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil no período entre 01/12/2015 a 08/04/2016.

**Tabela 1** - Identificação de clones comerciais.

Código	Cruzamento	Tolerância observada em campo	Grau de tolerância (observações de campo)	1º LOCAL DE SELEÇÃO
1CL	<i>E.cloeziana</i>	Tolerância	6	Itamarandiba - MG
2TC	1/2 <i>C. torelliana</i> ; 1/2 <i>C. citriodora</i>	Tolerância	8	Periquito -MG
3UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	4	Itamarandiba - MG
4UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
5UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
6GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	2	Entre Rios - BA
7GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
8GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
9GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Entre Rios - BA
10UC	1/2 <i>E.camaldulensis</i> ; 1/2 <i>E.grandis</i>	Tolerante	10	Biritinga - BA

**Tabela 2** - Caracterização climática do ambiente natural de origem das espécies utilizadas no cruzamento para formação dos clones testados.

Espécies	Clima	Precipitação (mm)	Altitude (m)	Temperatura média max. (°C)
<i>C. torelliana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.cloeziana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	40-100	29-34
<i>E.urophylla</i>	Temperada, tropical e subtropical	1500-2800	200-1200	27-36
<i>C. citriodora</i>	Temperada, tropical e subtropical	800-1200	0-1200	27-39
<i>E.grandis</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.camaldulensis</i>	Deserto, temperado, equatorial, tropical e subtropical	150-1100	20-700	26-39

**Tabela 3** - Características físicas e químicas do Latossolo Vermelho + 30% de areia.

Análise granulométrica (kg.kg <sup>-1</sup> )												
Areia	Silte	Argila	Classe textura			Equivalente em umidade (Kg Kg <sup>-1</sup> )						
0,632	0,123	0,181	Franco arenoso			0,18						
Análise química (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )												
pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	m	V	
H <sub>2</sub> O	...(mg/dm <sup>3</sup> )...		.....(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ).....									.....%.....
5,46	5,7	8	0,71	0,09	0,0	0,8	0,82	0,82	1,62	2	50,6	

\* Análise realizada no laboratório de análise de solos, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa.

A capacidade de campo do solo foi calculada através do método do equivalente de umidade (EU), em que amostras peneiradas de solos, ou seja, amostras deformadas de solo, previamente saturadas com água, foram centrifugadas a 1000 xg, durante 30 minutos, ao potencial de -33 kPa (Cassel e Nielsen, 1986), depois as amostras foram pesadas e levadas a estufa até atingirem massa seca constante. Foi considerada a capacidade de campo, a quantidade de água que permaneceu no solo após a centrifugação, que calculado pela diferença entre o peso úmido do solo e o peso seco, passou a ser considerada a quantidade de água necessária para atingir 100% da capacidade de campo do solo.

As mudas foram irrigadas por três meses para adaptação ao substrato e ao ambiente e para simulação das condições de chuva em campo, com lâmina de água ideal para atingir 90% da capacidade de campo do solo (CC) e, após esse período, foram aplicados os tratamentos durante 40 dias, sendo 50% da capacidade de campo do solo (CC), simulando déficit hídrico, e 90% da CC, simulando irrigação ideal.

### **Análises de trocas gasosas**

As avaliações das trocas gasosas, realizadas entre 08:00 h e 11:00 h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$ , temperatura e umidade ambientes, no segundo par de folhas completamente expandida (V4), por meio do analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluor\u00f4metro (modelo LI-6400xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA), resultaram nos seguintes par\u00e2metros: taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida do  $\text{CO}_2$  (A) e condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (gs).

As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila foram obtidas na mesma folha utilizada na medi\u00e7\u00e3o das trocas gasosas, utilizando o fluor\u00f4metro acoplado ao IRGA. Com as vari\u00e1veis registradas nas plantas adaptadas ao claro e ao escuro, foi obtido o seguinte par\u00e2metro: o rendimento qu\u00e2ntico potencial do PSII (Fv/Fm) (Genty et al. 1989; Bilger et al. 1995).

### **Condut\u00e2ncia estom\u00e1tica e Fv/Fm**

As trocas gasosas foram avaliadas com um analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluor\u00f4metro (modelo LI-6400xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA). Os seguintes par\u00e2metros foram obtidos: condut\u00e2ncia estom\u00e1tica de vapor d' \u00e1gua (gs). As medi\u00e7\u00f5es foram realizadas entre 08:00h e 11:00h, utilizando radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (PAR) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentra\u00e7\u00e3o atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$ , temperatura e umidade ambientes. As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila foram obtidas na mesma folha utilizada na medi\u00e7\u00e3o das trocas gasosas, utilizando o fluor\u00f4metro acoplado ao IRGA. Com as vari\u00e1veis registradas nas plantas adaptadas ao claro e ao escuro, foi calculado o seguinte par\u00e2metro: o rendimento qu\u00e2ntico potencial do PSII (Fv/Fm) (Genty et al. 1989; Bilger et al. 1995).

## **Avaliações quanto ao status hídrico da planta**

O status hídrico das plantas foi avaliado no último dia do experimento, na folha mais jovem, completamente expandida e sem diagnóstico fitossanitário. As medições foram realizadas entre 04:00h e 06:00h, utilizando-se uma bomba de pressão do tipo Scholander (Scholander et al. 1965). A planta é o indicador mais confiável do estado hídrico (Larcher, 1995).

## **Avaliação do sistema antioxidante enzimático**

Os extratos enzimáticos brutos para a determinação das atividades das enzimas, foram obtidos pela maceração de 300 mg de folhas em nitrogênio líquido, seguida de adição de 2 mL de meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al. 1999). O homogeneizado foi submetido à centrifugação a 12.000xg, por 15 min, à temperatura de 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto na determinação das atividades enzimáticas. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram executadas à temperatura de 4°C.

## **Determinação da atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, contendo metionina 13 mmol L<sup>-1</sup>, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e riboflavina 2 µmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a 25 °C, em uma câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971).

### **Determinação da atividade da catalase (CAT, EC1.11.1.6)**

A atividade da catalase será determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mmol L<sup>-1</sup> (Havir e Mchale 1987). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, será medido a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática será calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Anderson et al. 1995) e expresso em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca.

### **Determinação da atividade das peroxidases totais (POX, EC1.11.1.7)**

A atividade das peroxidases foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8, pirogalol 20 mmol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> (Kar e Mishra 1976). A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância durante o primeiro minuto de reação a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance e Maehley 1955) e expressa em μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca.

### **Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)**

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada pela adição de 0,01 mL do extrato enzimático bruto a 0,19 mL do meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (Nakano e Asada 1981, modificado por Koshiha 1993). O decréscimo na absorvância a 290 nm, à temperatura de 25°C, foi medido durante o primeiro minuto da reação, sendo a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta no intervalo de 0,4 a 0,6 minutos, após o início da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada 1981) e expressa em μmol de ácido ascórbico (AA) min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca.

## **Avaliação do sistema antioxidante não enzimático**

### **Determinação da concentração de glutatona total (GSH + GSSG)**

Amostras de 0,3 g de massa fresca de material vegetal foram trituradas em nitrogênio líquido, seguido da adição de 2 mL de meio de homogeneização constituído de HCl 0,1 M contendo EDTA 1mM (Anderson 1985). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000g por 15 min a 4 °C. Às alíquotas de 20 µL de extrato bruto foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de sódio 125 µM, contendo EDTA 6,3 mM, pH 7,5, 500 µL de NADPH 0,3 mM e 100 µL de DTNB [ácido 5,5'- ditio-bis (2-nitrobenzoico)] 6 mM. Após incubação a 30 °C, por 5 min, adicionaram-se 10 µL de redutase da glutatona (50 U mL<sup>-1</sup>) e a absorvância foi determinada a 412 nm durante 1 min. A concentração de glutatona foi determinada por meio de curva de calibração. Os resultados foram expressos em nmol g<sup>-1</sup> massa fresca.

### **Determinação da concentração de ascorbato e desidroascorbato**

Para determinação dos teores de ascorbato reduzido e ascorbato total, 0,3 g de amostras de folhas e de raízes foram homogeneizadas em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6% e centrifugadas por 5 min, a 4°C, para obtenção do extrato bruto. A seguir, 500 µL do extrato enzimático bruto foram adicionados a dois meios de extração para determinação do ascorbato total e ascorbato reduzido, sendo incubados a 42 °C, por 15 min, segundo proposto por Kampfenkel et al. (1995). A leitura da absorvância foi feita a 525 nm. A concentração de desidroascorbato foi calculada pela diferença entre ascorbato total e ascorbato reduzido. A concentração de ascorbato foi calculada por meio de curva de calibração.

### **Determinação do teor de prolina no material vegetal**

O teor de prolina livre no material vegetal foi determinado pela geração de um produto colorido com ninhidrina (Bates et al. 1973). Para obtenção deste produto 0,5 g de material vegetal foi homogeneizado com 3 mL de ácido sulfosalicílico 3%. O extrato foi centrifugado durante 10 min a 20000 xg, em seguida, 600 µL de ácido acético 96% e 600 µL de solução de ninhidrina foram adicionados à 600 µL de sobrenadante.

As amostras foram incubadas em tubos de ensaio durante 1 h, a 100 °C, seguido da adição de 3 mL de tolueno para extrair o produto da reação. As misturas foram agitadas e, quando duas camadas estavam separadas, 2 mL da fase superior foi analisada. A concentração do produto vermelho foi determinada pela absorvância a 520 nm. A preparação da curva padrão foi feita utilizando L-prolina (Sigma).

### **Determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos e antocianinas**

Os teores de clorofilas *a*, *b* e carotenoides foram determinados utilizando-se três discos foliares com 5 mm de diâmetro, retirados da segunda folha totalmente expandida, e incubados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), saturado com CaCO<sub>3</sub>, à temperatura ambiente por 48 h. As absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (UV-visível Quimis 0790U2M) e os valores utilizados para cálculo dos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides, conforme metodologia de Wellburn (1994).

Para a quantificação de antocianinas, amostras de 0,1 g de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em 5 mL de metanol – HCl 1% (v/v) em banho de gelo e centrifugadas a 10.000 g por 30 min, a 4°C. O teor total de antocianina foi determinado pela diferença entre a absorvância a 536 e 600 nm (Hodges et al. 1999) e os resultados expressos em µg g<sup>-1</sup> MF (massa fresca), como equivalentes de cianidina-3-glucosídeo, através do coeficiente de extinção molar (26900 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>).

### **Concentração de espécies reativas de oxigênio**

Para determinação da concentração de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), amostras de 50 mg de folhas foram incubadas em meio de extração constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min. A leitura da absorvância foi feita a 480 nm, durante 5 minutos (Boveris et al. 2002; Misra e Fridovich, 1971). A produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> (Boveris et al. 2002).

Para determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), amostras de 200 mg de tecido foliar foram homogeneizadas em meio de extração constituído de

tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, e centrifugadas a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo FeNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos e a absorvância determinada a 560 nm. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Análise estatística**

Os experimentos foram realizados de acordo com um esquema fatorial 2x10 (2 capacidades de campo e 10 clones diferentes), com 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com uma planta. Foram avaliados dois percentuais da capacidade de campo do solo (CC), aplicados de acordo com a diferença de peso do sistema (vaso, solo, tutor e água) para atingir (50% e 90% CC) simulando, respectivamente déficit hídrico e irrigação ideal.

Em relação às variáveis, foi feito teste de Normalidade Shapiro-Wilk, todas variáveis foram submetidas à ANOVA e estimativa dos parâmetros genéticos, obtidas utilizando software GENES/UFV no modelo fatorial simples:

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = m + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : valor fenotípico do caráter Y medido no material genético i, no ambiente j

m: média geral paramétrica dos dados em estudo

$G_i$ : efeito do i-ésimo genótipo

$B/A_{jk}$ : efeito de blocos dentro de ambiente

$A_j$ : efeito do j-ésimo ambiente experimental

$GA_{ij}$ : efeito da interação do i-ésimo genótipo com o j-ésimo ambiente

$E_{ijk}$ : erro médio associado à observação  $Y_{ijk}$

Considerando o efeito de genótipo como fixo e o efeito de ambiente aleatório. Para a comparação entre as médias de cada clone, para cada variável, foi realizado o teste de média, Tukey (5% de probabilidade). O resultado foi apresentado em gráfico para cada variável, priorizando a disposição das barras conforme o ranqueamento dos

clones para déficit hídrico, facilitando a visualização do comportamento susceptível e tolerante.

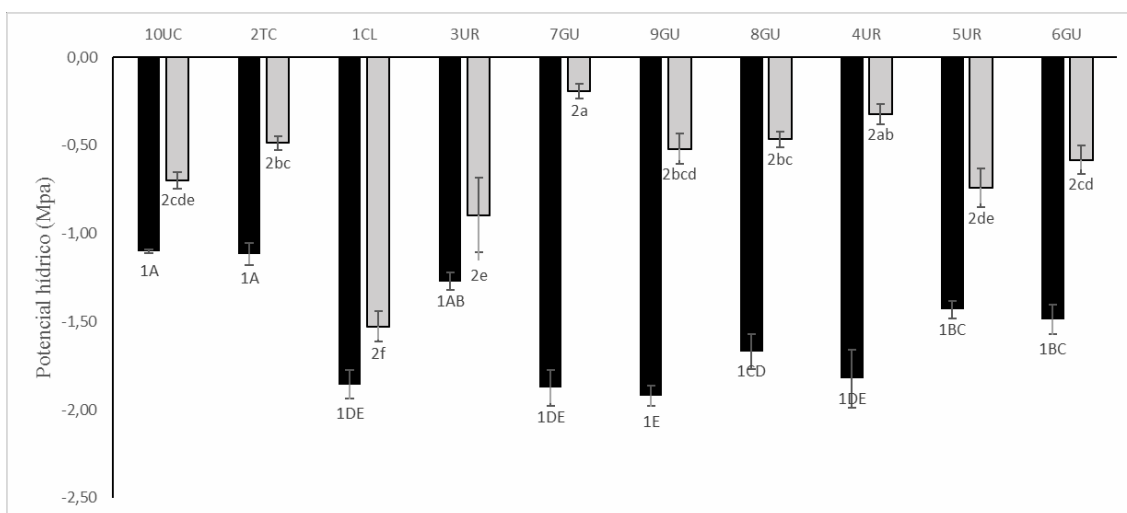
Para avaliação da importância dos caracteres na avaliação dos clones tolerantes ao déficit hídrico foi realizada uma análise multivariada de componentes principais, variáveis canônicas, dissimilaridade e correlações canônicas (Software GENES, Cruz 2013).

Algumas variáveis apresentadas no Capítulo1, foram analisadas novamente no Capítulo2, pois precisamos garantir que os clones selecionados como tolerantes sejam avaliados também quanto à produtividade dos mesmos.

## Resultados e discussões

### Análise estatística univariada

Ocorreu diferença estatística para todos os clones, entre os tratamentos, e sempre as plantas com condição de irrigação ideal estavam mais hidratadas que as sob déficit hídrico. Os clones 10 UC e 2 TC permaneceram mais hidratados, mesmo sob déficit hídrico e são considerados tolerantes em campo. O clone 7 GU apresentou menor potencial hídrico sob déficit hídrico e maior diferença entre os dois tratamentos, sendo nove vezes mais hidratado em condição ideal de irrigação que sob déficit hídrico e próximo ao valor encontrado por Shvaleva et al. (2005). Corroborando com o resultado apresentado por McKiernan et al. (2017), os *E. globulos* testados quanto a tolerância de déficit hídrico moderado apresentaram valores mais negativos para o potencial hídrico assim como ocorreu para todos os clones testados no presente trabalho (Figura 1).

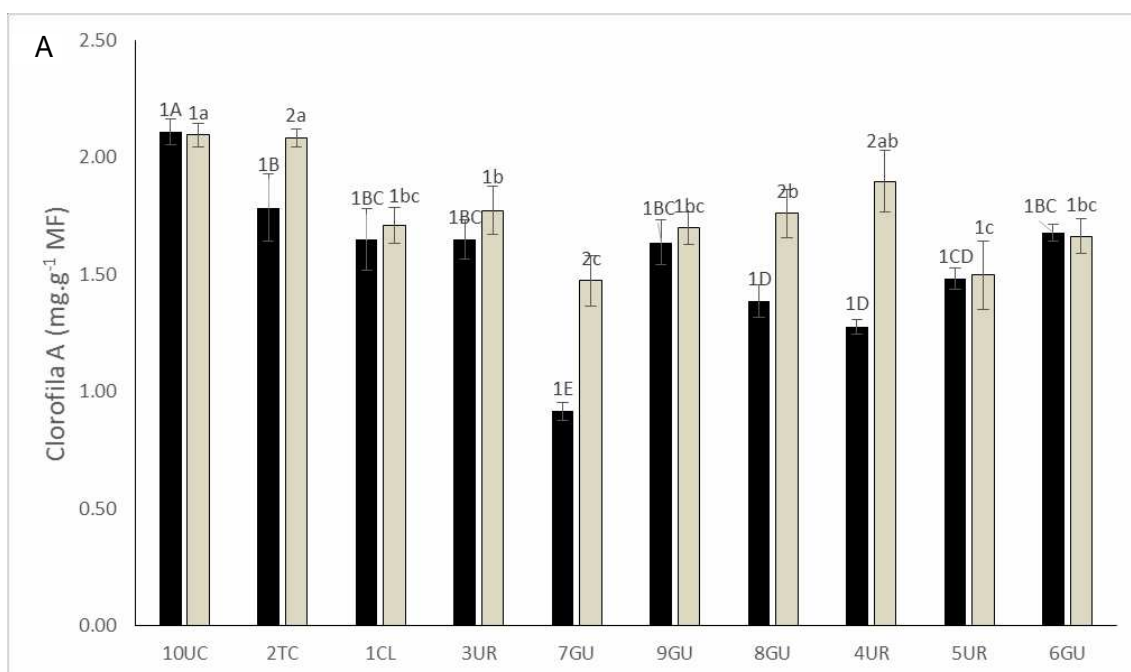


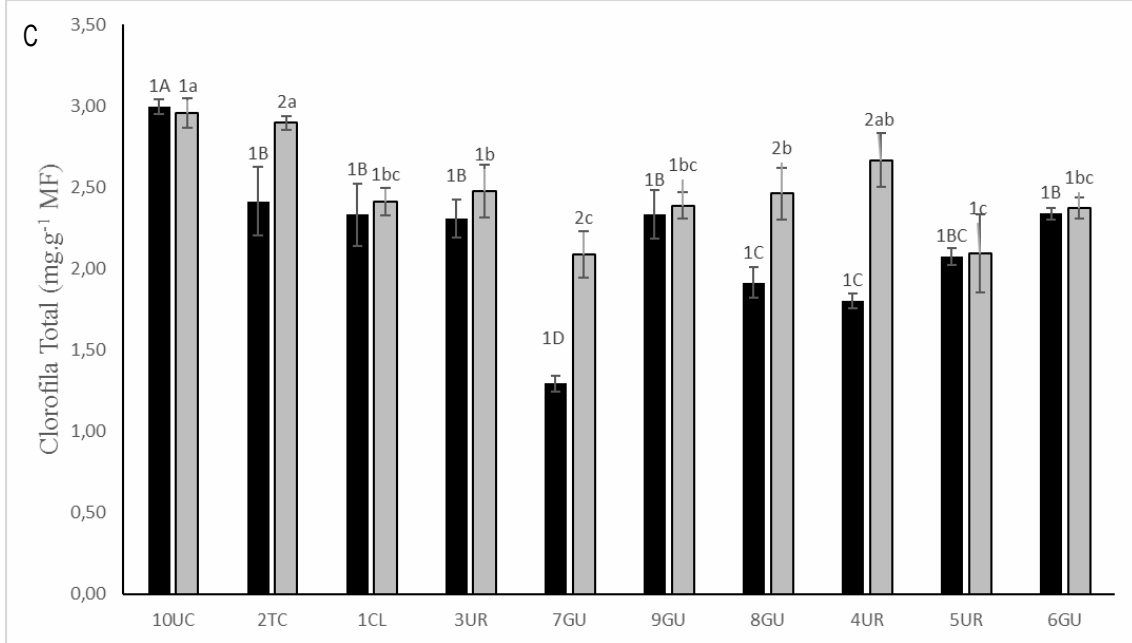
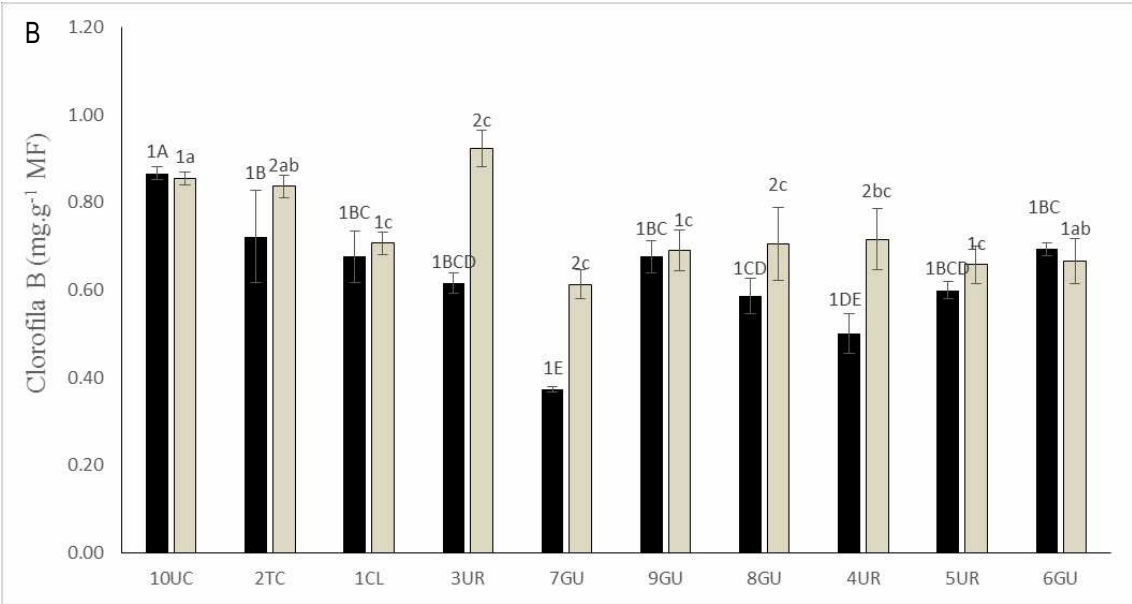
**Figura 1** - Potencial hídrico (Mpa) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) ■ controle (CC 90%) □ Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento deficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

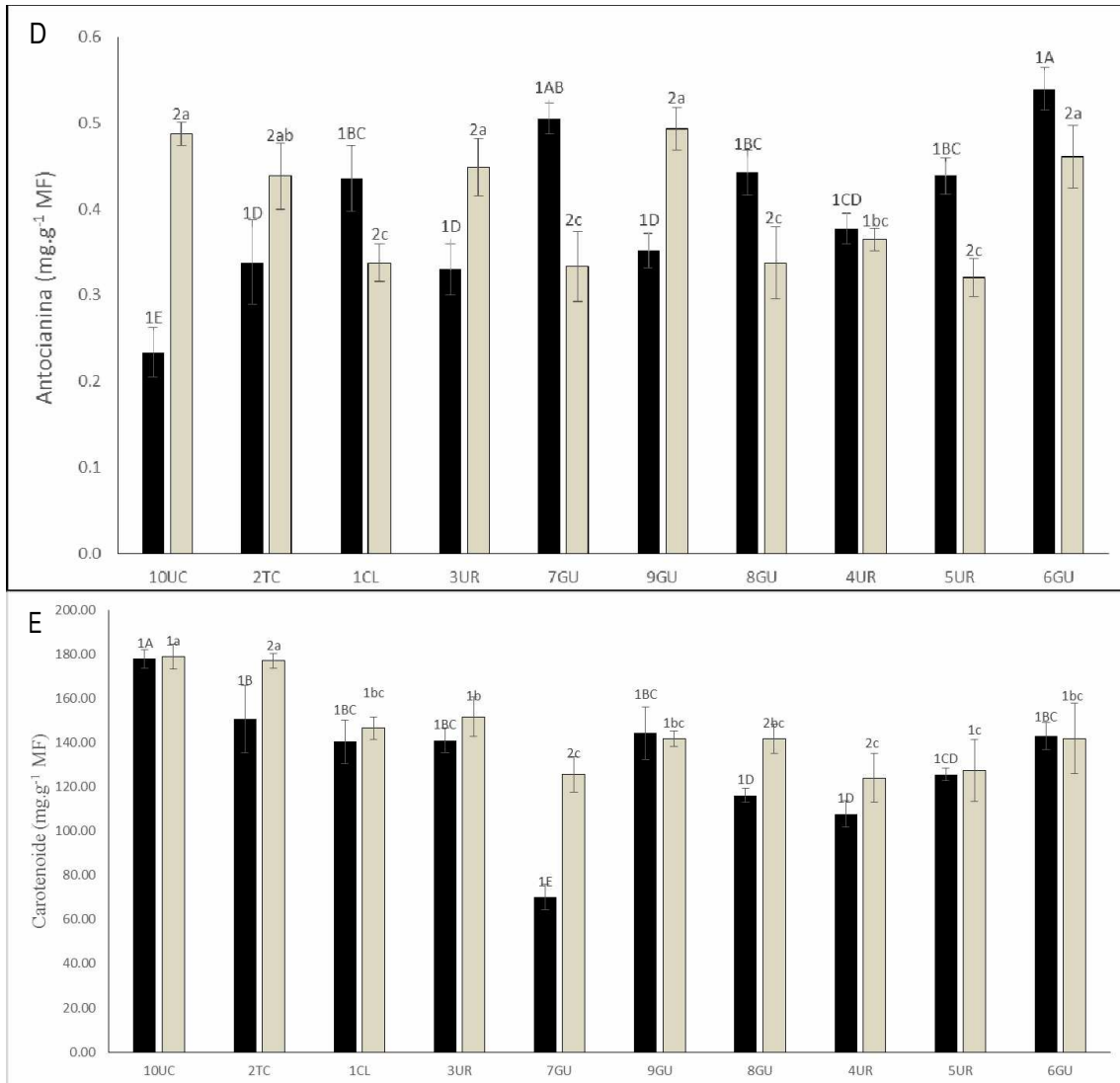
Os teores de clorofila *a* dos clones 1 CL, 3 UR, 5 UR, 9 GU e 10 UC não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, já os demais clones testados apresentaram diferença e maiores concentrações para o tratamento de irrigação ideal

(Figura 2A). Porém, o clone 10 UC, mesmo não apresentando diferença estatística entre os tratamentos, foi o clone com maior concentração de clorofila *a*. O clone 8 GU apresentou a menor contração de clorofila *a* sob déficit hídrico e maior diferença entre os tratamentos. Para o teor de clorofila *b* (Figura 2 B), os clones 1 CL, 5 UR, 6 GU, 10 UC, 10 UC não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. O clone 3 UR apresentou a maior diferença entre os tratamentos e o 7 GU apresentou a menor concentração quando submetido ao déficit hídrico. Para clorofila total, os clones 1 CL, 3 UR, 5 UR, 6 GU, 9 GU e 10 UC não apresentaram diferença estatística. O clone que apresentou maior teor de clorofila total foi o clone 10 UC, para ambos os tratamentos, e o menor foi o 7 GU, que também apresentou maior diferença entre os tratamentos.

Para a antocianina, apenas o clone 4 UR não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, sendo que os clones que apresentaram maior concentração sob déficit hídrico foram 1 CL, 5 UR, 6 GU, 7 GU e 8 GU (Figura 2D). Para carotenoides, ocorreu diferença estatística entre clones e tratamentos. Porém, foi observado que nenhum dos clones aumentou a produção de antocianina quando submetidos ao déficit hídrico. O clone 10 UC e o 2 TC apresentaram as maiores quantidades de carotenoides nos dois tratamentos, sendo os dois considerados tolerantes (Figura 2E).







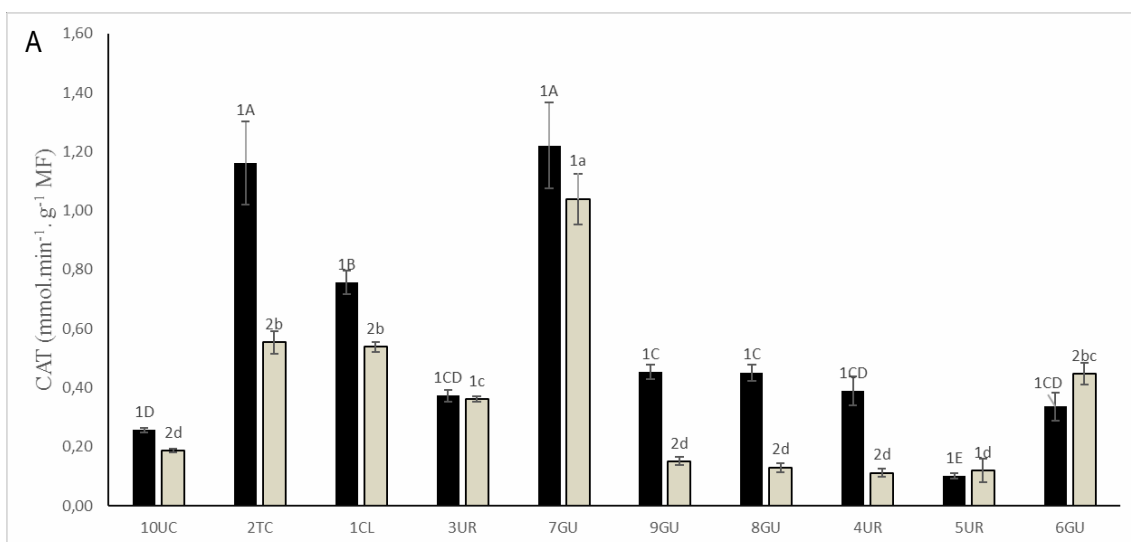
**Figura 2** - Concentração de clorofila *a* (mg g<sup>-1</sup> MF) (A), clorofila *b* (mg g<sup>-1</sup> MF) (B), Clorofila Total (mg g<sup>-1</sup> MF) (C), Antocianina (mg g<sup>-1</sup> MF) (D), Antocianina (mg g<sup>-1</sup> MF) (E) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

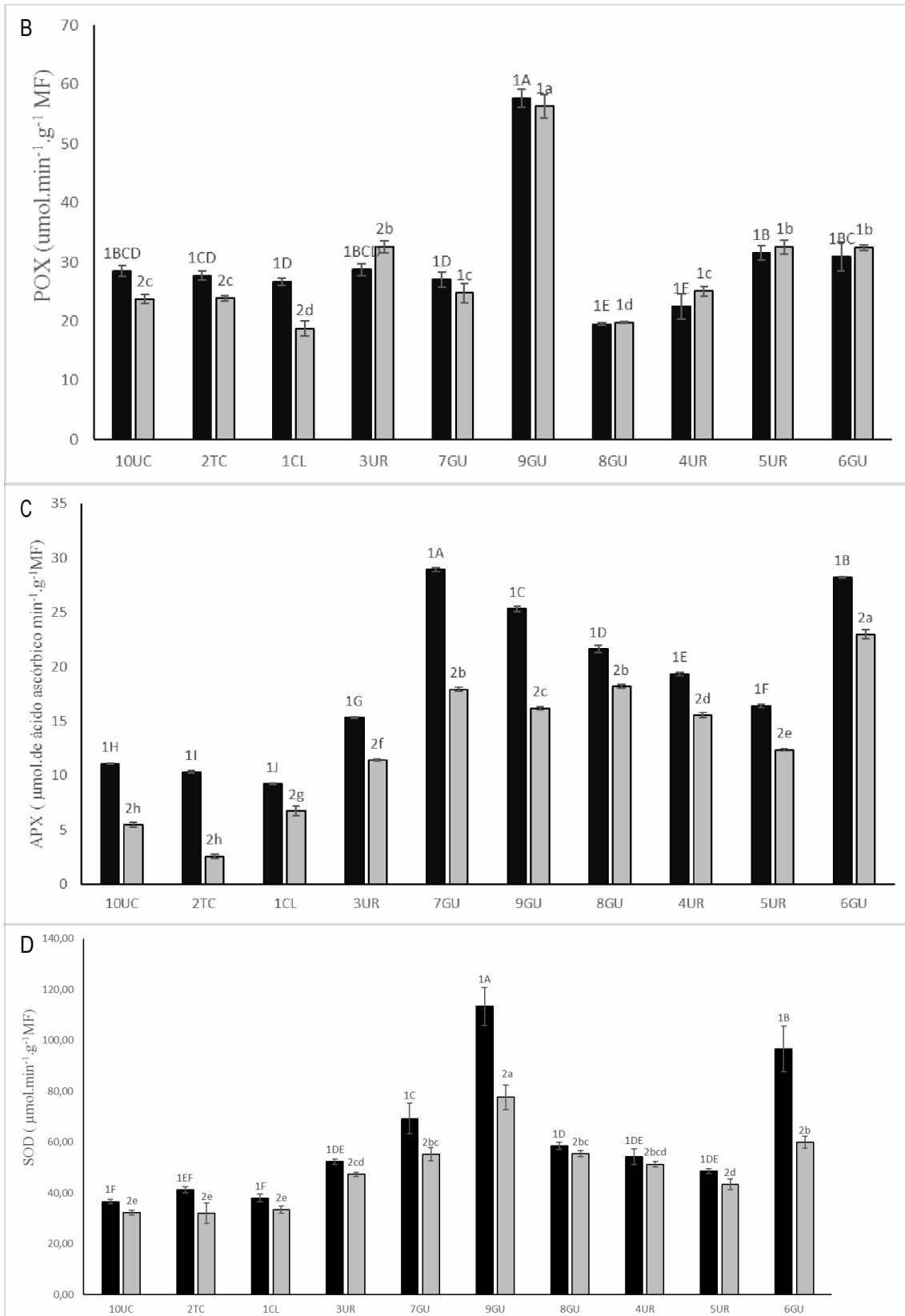
Os clones 2 TC, 1CL, 9 GU, 8 GU, 4 UR e 10 UC apresentaram diferença estatística e maior atividade de CAT quando sob déficit hídrico (Figura 3A). Sendo que o clone 2 TC teve atividade aproximadamente o dobro de CAT quando estressado e os clones 4 UR, 9 GU e 8 GU tiveram atividade aproximadamente o triplo quando estressados.

O comportamento dos clones quanto à atividade de POX foi distinto, sendo que o clone 3 UR apresentou diferença estatística entre os tratamentos, mas teve menor atividade de POX quando estressado. Já s clones 2 TC, 1 CL e 10 UC apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e apresentando maior atividade de POX quando estressados, sendo que esses três clones são os clones considerado tolerantes em campo. O clone 9 GU não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, mas obteve maior atividade, aproximadamente o dobro, de POX nos dois tratamentos (Figura 3B).

Ocorreu diferença estatística entre os clones e entre os tratamentos, sendo que em situação de déficit hídrico, todos os clones reagiram aumentando a atividade de APX. Destaca-se os clones 2 TC, 10 UC que tiveram atividade aproximadamente maior que o dobro da testemunha que não sofreu estresse (Figura 3C).

Apesar de todos os clones terem produzido mais SOD quando estressados e apresentado diferença estatística entre os tratamentos, apenas os clones 9 GU, 6 GU e 7 GU apresentaram grande diferença entre a quantidade produzida com e sem estresse (Figura 3D).





**Figura 3** - Atividade das enzimas CAT (A), POX (B), APX (C), SOD (D), em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento

irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

Os clones 7 GU, 2 TC, 5 UR, 1 CL e 10 UC produziram mais glutatona sob estresse hídrico que em condição ideal de irrigação. Os 3 clones que tiveram maior incremento percentual na produção de glutatona, da condição ideal de irrigação para condição de déficit hídrico, foram os clones 2 TC, 1 CL e 10 UC, sendo os considerados tolerantes em condição de campo (Figura 4A).

Apenas os clones 2 TC, 9 GU e 4 UR apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e responderam ao estresse aumentando a atividade de ascorbato total, mas o clone que possui maior atividade de ascorbato total é o clone 10 UC (Figura 4B).

Na Figura 4C, pode-se observar que todos os clones apresentaram diferença estatística entre os tratamentos e produziram mais ascorbato quando estressados. Os clones que apresentaram maior diferença entre os tratamentos foram os 2 TC, 1 CL, 6 GU, 4 UR e 9 GU, mas o clone que mais produz ascorbato com e sem estresse é o clone 10 UC.

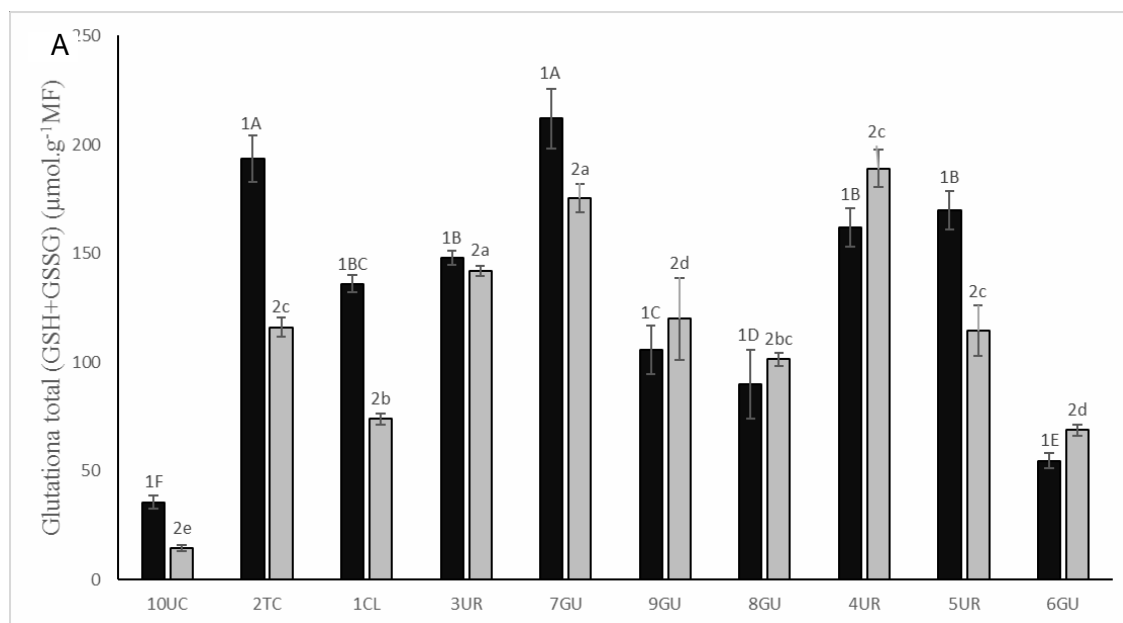
Os clones que responderam ao estresse hídrico produzindo mais desidroascorbato e obtiveram diferença entre os tratamentos foram os 2 TC, 4 UR e 9 GU. Já os clones 6 GU e 1 CL apresentaram diferença entre os tratamentos, mas menor quantidade foi encontrada quando submetidos ao estresse hídrico. Os clones 7 GU, 3 UR, 8 GU, 5 UR e 6 GU produziram, aproximadamente, a mesma quantidade quando estressados e não estressados (Figura 4D).

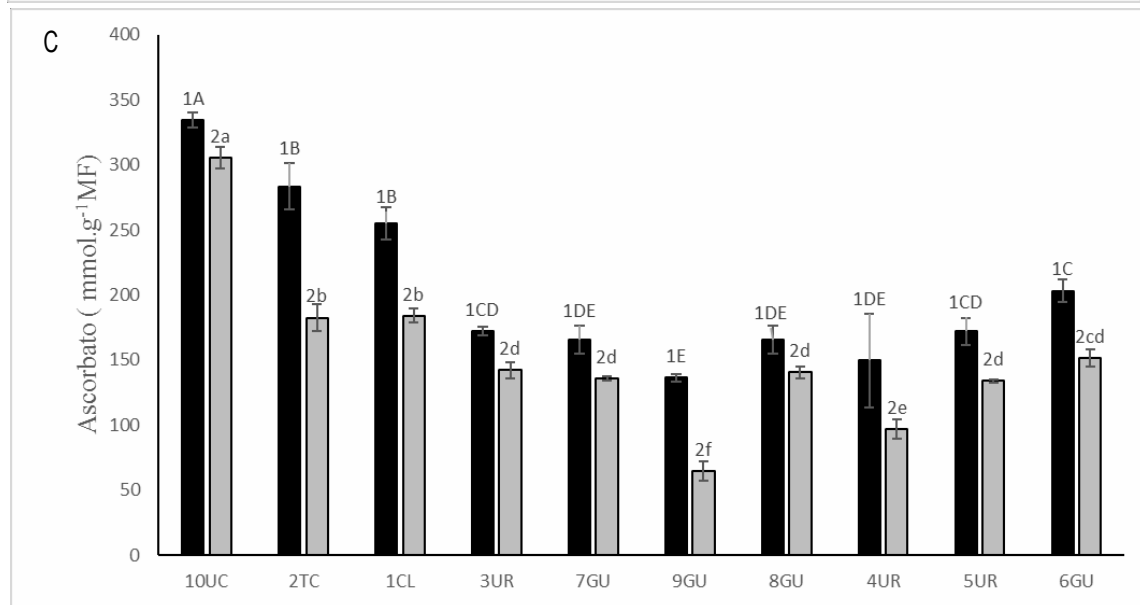
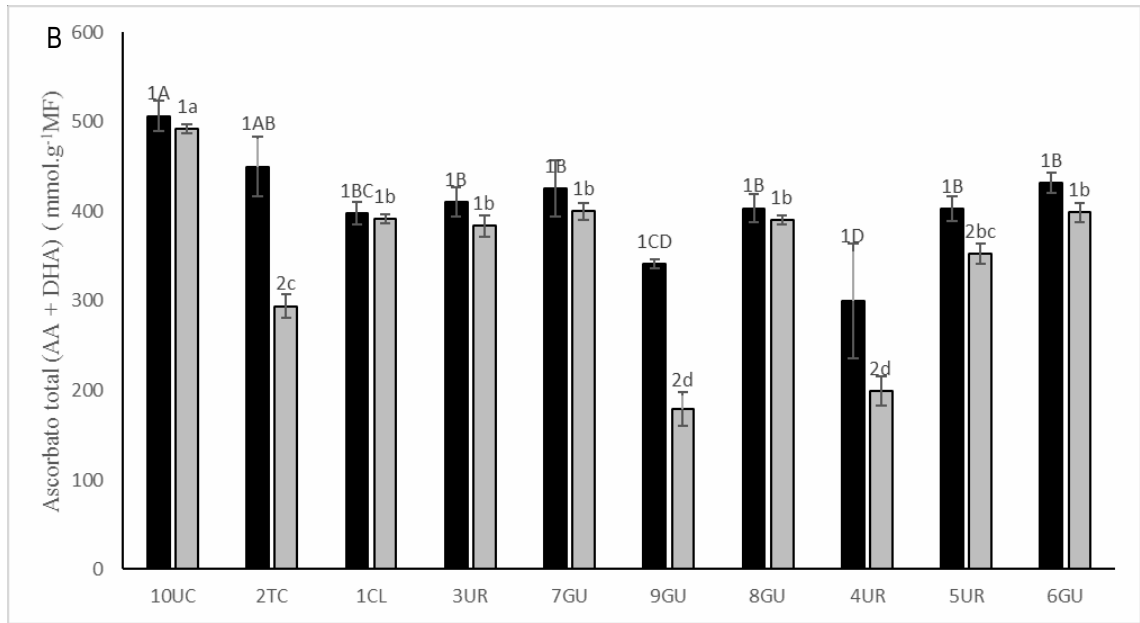
Os clones 10 UC, 1 CL e 2 TC foram os clones que apresentaram maior relação ascorbato/desidroascorbato, sendo que o 1 CL produziu quase o dobro a mais quando estressado e o 2 TC não apresentou diferença entre os tratamentos. Os demais clones produziram em média metade da relação dos clones considerados tolerantes (Figura 4E).

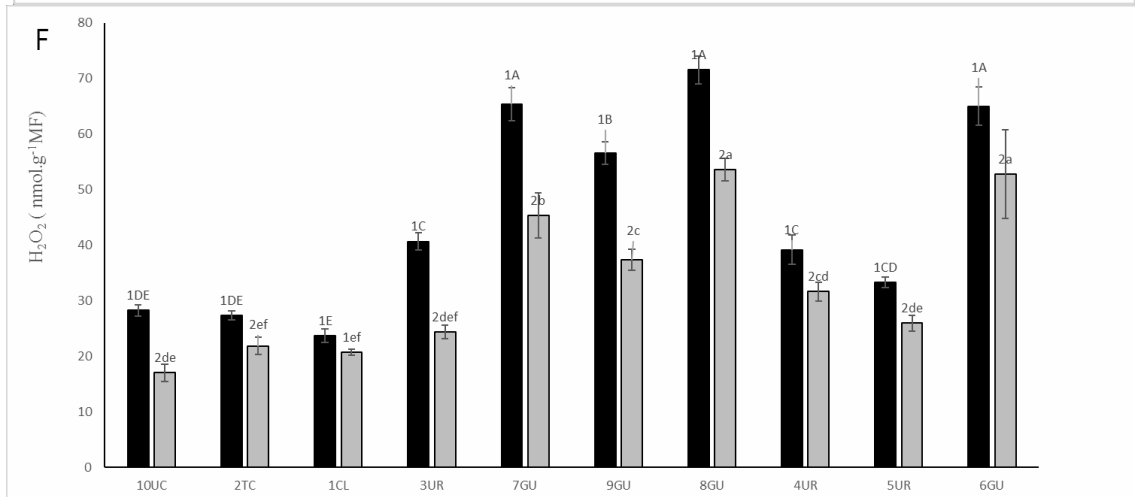
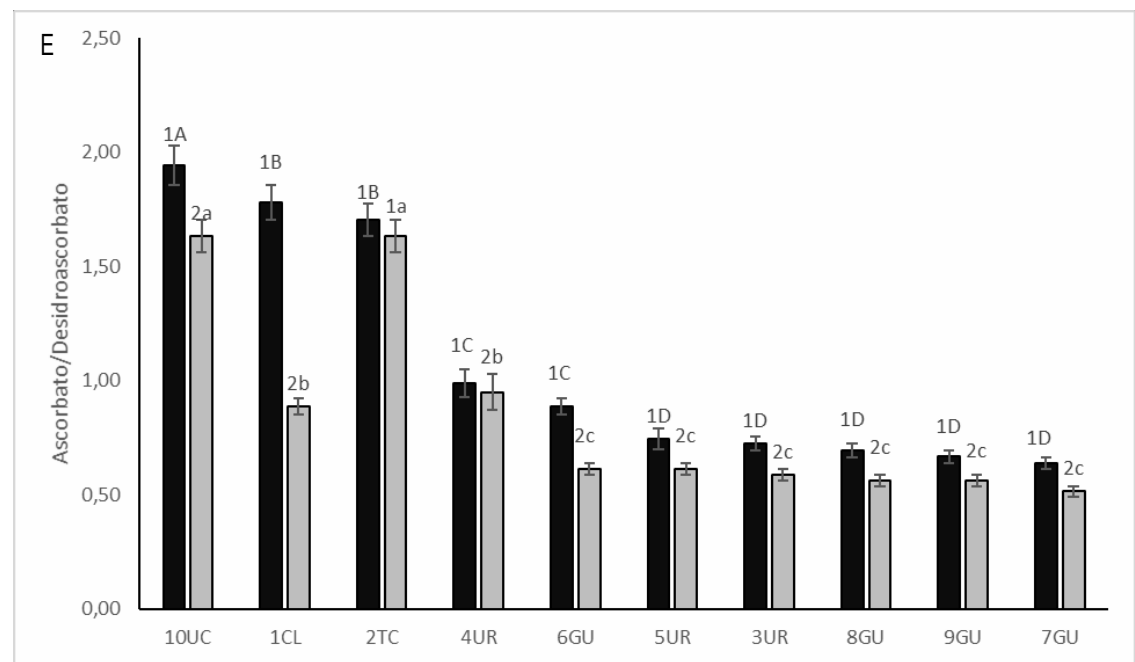
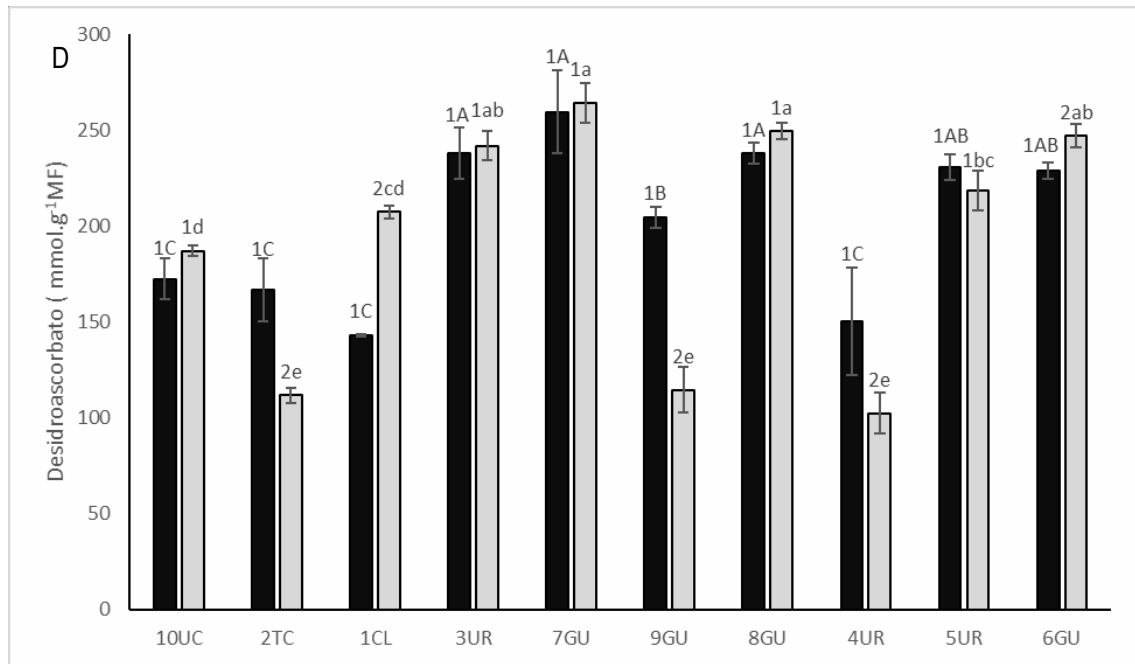
Quanto à produção de peróxido e ânion superóxido, os clones 10 UC, 2 TC e 1 CL foram os que apresentaram menor quantidade de peróxido (Figura 4F) e maior quantidade de ânion superóxido (Figura 4G). Esses clones, juntamente com o 6 GU ficaram menos estressados com o déficit hídrico que os demais. A alta concentração de ânion superóxido em relação ao peróxido pode ser explicada pela baixa concentração de SOD (Figura 4G), enzima responsável por transformar ânion superóxido em peróxido de oxigênio. Além desse fator, também se pode observar que as concentrações de ascorbato (Figura 4C) e catalase (Figura 4A) foram maiores para esses clones em

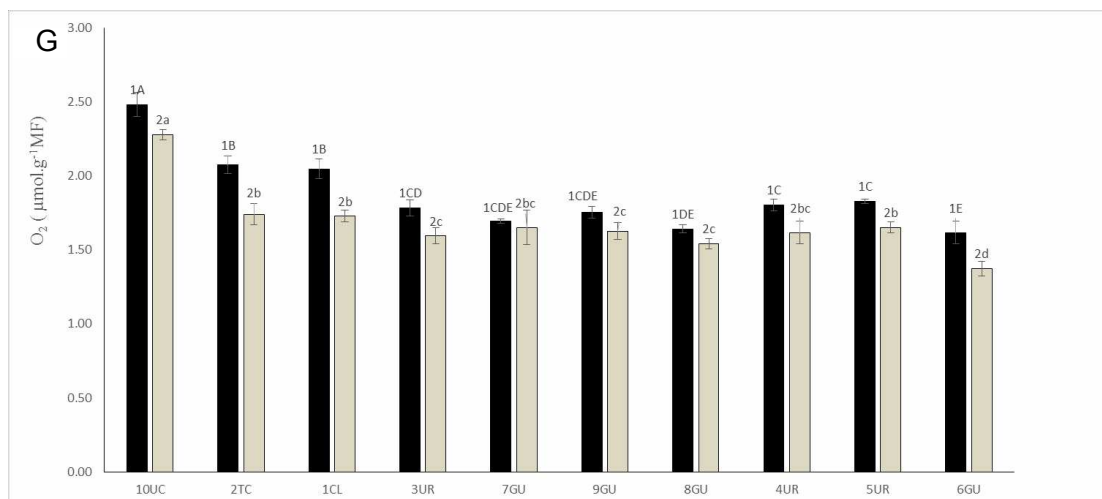
resposta ao estresse. Sendo que eles apresentaram as maiores concentrações de SOD (Figura 4D).

O déficit hídrico pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Smirnoff 1998) que podem desempenhar um papel na sinalização intracelular (Finkel 1998) além de causar estresse oxidativo (Rubio et al. 2002). A eliminação ou redução dos EROs dependem de um sistema de enzimas e metabólitos antioxidantes (Polle e Rennenberg 1992). Enzimas como a glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) desempenham um papel fundamental à eliminação de ROS, como o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), que são os iniciadores de uma cadeia de reação que leva à degradação de componentes celulares (Sgherri et al. 2000). Sob condições adequadas de crescimento, as enzimas e os metabólitos antioxidantes das folhas reduzem ROS e os deixam em níveis adequados, minimizando assim o dano oxidativo (Smirnoff 1998). Durante períodos de estresse ambiental, por exemplo, períodos de seca ou alta irradiância, em que ocorre maior produção de ROS, outros mecanismos de proteção são requeridos, como a produção de  $\beta$ -caroteno, zeaxantina e antheraxantina (Garcia Plazaola et al. 1997, Medrano et al. 2002).









**Figura 4** - Glutathiona (A), ascorbato total (B), ascorbato (C), desidroascorbato (D), ascorbato/desidroascorbato (E), peróxido (F), ânio superóxido (G) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) ■ e controle (CC 90%) □ Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento deficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

## Análise estatística multivariada

### Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico)

Na Tabela 4 encontram-se os autovetores e as variáveis originais nas duas primeiras componentes principais, bem como a variância explicada por essas variáveis latentes. Observa-se que as duas primeiras componentes principais apresentam os maiores autovalores e explicaram 71,26% da variância total dos dados.

Analisando-se a primeira componente principal, observa-se que os maiores autovetores positivos são relativos à ANSUP, ASC/DASC, ASC, CLOA, CLOB e CLOTOT. Os autovetores negativos mais significativos referem-se a FOTOS e APX. Logo, os maiores valores para esses componentes (score) favorecerão a maior quantidade de características que possuem interação positiva, uma vez que maiores valores desses escores contribuem para maiores valores da maioria de variáveis que apresentaram interação significativa com o componente 1.

Para a componente principal 2, observam-se autovetores positivos e significativos apenas referentes às variáveis CAT e GLUT. Para as variáveis CLOTOT,

CAROT, POX, e SOD foram obtidos autovetores negativos e com elevada contribuição nessa componente principal. Logo, como valores negativos significativos contempla maior quantidade de variáveis, quanto menor os valores de escores dessa componente principal, maior serão os valores das variáveis que apresentaram relação positiva.

Diante dos autovetores obtidos, pode-se afirmar que as duas primeiras componentes principais reúnem grande quantidade de características favoráveis e relevantes para a seleção de clones de eucalipto para a produção em áreas com limitações hídricas. Nota-se que, no componente principal 1, as duas maiores contribuições são das variáveis ANSUP e ASC/DASC, e para a componente principal 2, das variáveis GLUT e CAT.

A Tabela 5 apresenta a matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados, considerando os escores das duas primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

**Tabela 4** - Autovetores das duas primeiras componentes principais.

Variáveis Originais	Autovetores	
	Componente 1	Componente 2
FOTOS	-0,2627	-0,1857
CONDU	-0,2115	-0,2369
FV/FM	0,2312	-0,0486
POTHID	0,2039	-0,0783
CLOA	0,2664	-0,2483
CLOB	0,2624	-0,2591
CLOTOT	0,2639	-0,2609
ANTOC	-0,2112	0,0455
CAROT	0,2569	-0,2676
CAT	-0,0202	0,3522
POX	-0,0215	-0,3017
SOD	-0,1737	-0,3407
APX	-0,2567	-0,1885
GLUT	-0,1026	0,4163
ASCT	0,1747	-0,0425
ASC	0,2795	0,0617
DASC	-0,2013	-0,1542
ASC/DASC	0,2806	0,1376
PEHID	-0,2384	-0,1928
ANSUP	0,2816	0,0706
<b>Autovalores</b>	10,74	3,52

<b>Variância explicada</b>	53,68	17,58
<b>Variância explicada acumulada</b>	53,68	71,26

**Tabela 5** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,0085								
3	0,3105	0,3681							
4	0,1773	0,2618	0,1867						
5	0,2496	0,3183	0,0162	0,0942					
6	1,0073	1,0841	0,2071	0,7229	0,3096				
7	0,4610	0,5939	0,4786	0,0919	0,3203	1,0935			
8	0,4252	0,5209	0,0451	0,1365	0,0266	0,2458	0,3062		
9	0,9874	1,0692	0,1946	0,6849	0,2889	0,0012	1,0350	0,2204	
10	0,5104	0,4594	0,3693	0,8487	0,4900	0,5698	1,4950	0,6722	0,5948

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

A dispersão dos clones de eucalipto (considerando os clones do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*), em função dos escores e diagrama de ordenação dos autovetores das duas primeiras componentes principais, para as variáveis avaliadas, pode ser visualizada na Figura 5, em um plano 2d.

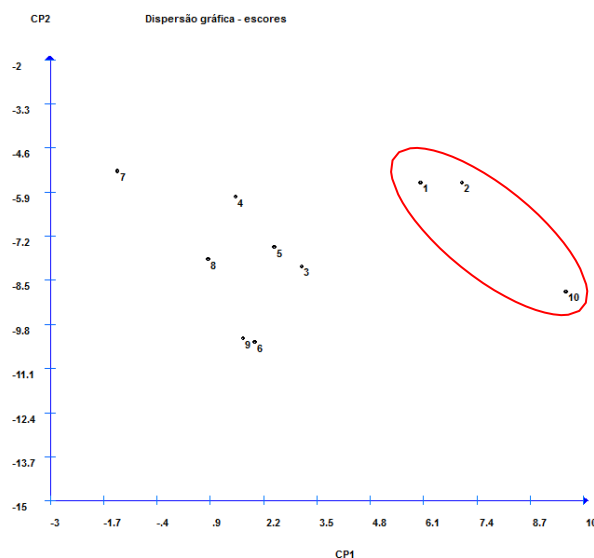
Avaliando a Figura 5, podemos observar o distanciamento no gráfico, em relação à maioria dos clones, dos clone 1, 2 e 10, que são conhecidos como tolerantes ao déficit hídrico em condição de campo, nos plantios comerciais no Nordeste da Bahia. Neste gráfico, podemos observar o clone 10 (10 UC híbrido de *E. urophylla* com *E. camaldulensis*) distante dos demais, ocupando a extremidade direita do gráfico, sendo fortemente influenciado pela componente principal 1.

Os clone 1 e 2 se posicionam próximos, em um ângulo de 45 graus no gráfico e um pouco acima do clone 10, indicando forte influência das componente 1 e 2. Essa diferença de posicionamento entre os clones considerados mais tolerantes a déficit hídrico no gráfico da Figura 5, por estar sob diferentes influências das variáveis, sugere mecanismos diferentes de tolerância para estes três materiais genéticos pertencentes a espécies distintas do gênero *Eucalyptus*.

A proximidade no gráfico da Figura 5 e o baixo valor de dissimilaridade na Tabela 4, 0,0085 para o valor do quadrado da distância euclidiana entre os clones 1 e 2, e 0,0012 entre os clones 6 e 9, indica similaridade de comportamento entre os mesmos. Para os clones 6 e 9, essa similaridade é confirmada por se tratar de pares de mesma espécie, onde o clone 6 (clone 6 GU) e 9 (clone 9 GU) são materiais genéticos híbridos

de *E. grandis* com *E. urophylla*. A análise mais detalhada da Figura 6 nos indica uma ligeira separação entre o grupo de espécies por meio das duas primeiras componentes principais 1 e 2, posicionando os clones de *E. urophylla* (3,4 e 5) no meio do gráfico, os clones híbridos entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* ( 6, 7, 8, e 9) em alinhamento diagonal, próximo ao ponto de origem do gráfico, e os clones tolerantes 1 (*E. cloeziana*), 2 (híbrido entre *Corimbia citriodora* e *Corimbia toreliana* ) e 10 (híbrido entre *E. urophylla* e *E. camaldulensis*) mais distantes do ponto de origem do gráfico.

Essa informação, obtida pela interpretação da Figura 5, indica interações com as variáveis em estudo, diferentes entre as espécies de eucalipto e semelhantes entre clones dentro de uma mesma espécie. Dessa forma, a extrapolação de interpretações de uma espécie de eucalipto para outra, quando o trabalho envolve seleção precoce e via marcadores fisiológicos, deve ser feita com rigor e cautela.



**Figura 5** - Dispersão dos clones em função dos escores das duas primeiras componentes principais.

### **Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico)**

A análise de variáveis canônicas foi utilizada, também, por ser um procedimento estatístico multivariado eficiente para avaliação do grau de similaridade entre os materiais genéticos em estudo (clones de eucalipto), levando-se em conta muitas variáveis na análise.

O objetivo principal dessa análise foi proporcionar a simplificação estrutural dos dados, de forma que a divergência genética, influenciada, em princípio, por um conjunto

com muitas variáveis, possa ser avaliada por um conjunto com poucas variáveis (variáveis canônicas), que são combinações lineares do conjunto maior, não correlacionadas e que possibilita uma avaliação gráfica bi ou tridimensional de fácil interpretação. Essas variáveis canônicas são, também, denominadas de super variáveis, pois representam mais de uma variável original de grande importância na explicação da diversidade entre os clones.

Na Tabela 6, encontram-se as estatísticas utilizadas na avaliação das nove variáveis canônicas, quando comparadas as 16 variáveis consideradas mais importantes e desconsiderando as variáveis redundantes, removendo, assim, CLOTOT, ASC, DASC e ASC/DASC. Para esta análise, a remoção de variáveis redundantes é importante para evitar o efeito de multicolinearidade.

Observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas foram estatisticamente significativas e explicaram mais de 95% da variância total dos dados, com elevado R<sup>2</sup> canônico. Logo, as informações mais relevantes dos dados originais estão contidas nessas duas variáveis canônicas.

**Tabela 6** - Estatísticas utilizadas na avaliação das nove primeiras variáveis canônicas.

<b>Variável canônica</b>	<b>R<sup>2</sup> canônico</b>	<b>Autovalor</b>	<b>F aproximado</b>	<b>NivSig</b>	<b>VARE</b>	<b>VAREA</b>
1	0,821	7062,30	9,21	0,001	70,80	70,80
2	0,793	2482,88	8,57	0,001	24,89	95,69
3	0,721	190,99	6,12	0,001	1,91	97,61
4	0,693	94,31	6,08	0,001	0,95	98,55
5	0,534	77,50	6,41	0,001	0,78	99,33
6	0,474	47,49	6,32	0,01	0,48	99,81
7	0,421	11,50	7,14	0,01	0,12	99,92
8	0,374	5,24	6,02	0,01	0,05	99,97
9	0,336	2,66	6,03	0,01	0,03	100,00

NivSig: Nível de Significancia; VARE: Variância explicada (%); VAREA: Variância explicada acumulada (%)

Na Tabela 7, encontram-se os valores dos autovetores ponderados e a contribuição das variáveis originais nas duas primeiras variáveis canônicas, bem como a variância explicada por essas variáveis.

Nota-se que as variáveis POTHID, ANTOC, CAROT E CAT apresentaram autovetores menos expressivos para as variáveis canônicas 1 e 2. Dessa forma, essas variáveis podem ser consideradas de baixa relevância no processo de agrupamento dos clones, tendo como base as duas primeiras variáveis canônicas analisadas. Podemos

identificar grande importância da variável CLOB, para a variável canônica 1, e da variável original FOTOS, para a variável canônica 2. Além dessas variáveis originais (CLOB e FOTOS), com influência específica para uma das variáveis canônicas, podemos destacar as variáveis originais, CLOA, CLOB e GLUT, que apresentaram valores de autovetores significativos para as variáveis canônicas 1 e 2.

Assim, podemos considerar que as variáveis FOTOS, FV/FM, CLOA, CLOB e GLUT podem ser muito importantes no agrupamento e seleção de clones de eucalipto para tolerância ao déficit hídrico. Essas mesmas variáveis estavam incluídas no grupo de variáveis importantes na análise de componentes principais, reforçando a importância das mesmas.

**Tabela 7** - Autovetores das variáveis originais nas duas primeiras variáveis canônicas.

Variáveis Originais	Autovetores	
	Variável Canônica 1	Variável Canônica 2
FOTOS	-0,0847	4,5176
CONDU	0,4061	-2,3124
FV/FM	-1,0499	4,2425
POTHID	0,2730	-0,1289
CLOA	1,068	-3,4454
CLOB	-1,7936	2,5676
ANTOC	-0,2101	-0,0465
CAROT	-0,3897	0,4425
CAT	-0,3227	0,0815
POX	1,4393	-1,3144
SOD	-0,2543	2,2463
APX	1,3769	0,3548
GLUT	1,5753	-3,7903
ASCT	-0,4489	2,4187
PEHID	1,4175	-0,0331
ANSUP	-0,2321	0,9288
<b>Autovalores</b>	<b>7062,30</b>	<b>2482,88</b>
<b>Variância explicada</b>	<b>70,80</b>	<b>24,89</b>
<b>Variância expl acumulada</b>	<b>70,80</b>	<b>95,69</b>

Para auxiliar a formação e separação de grupos similares de clones, com base nos escores referentes às duas primeiras variáveis canônicas, também foi determinada a matriz de dissimilaridade entre os clones considerando a distância euclidiana quadrática, que pode ser vista na Tabela 8.

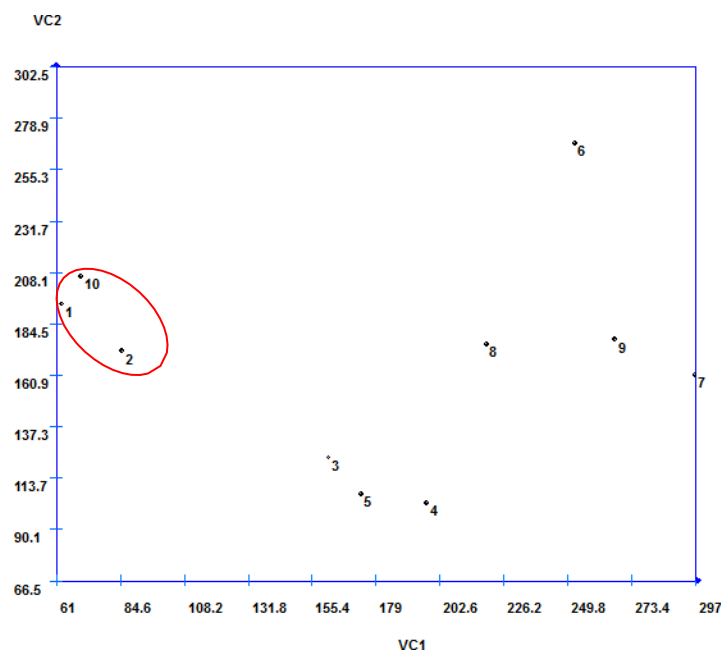
**Tabela 8** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,0260								
3	0,3595	0,1943							
4	0,6381	0,4105	0,0401						
5	0,5004	0,2994	0,0126	0,0116					
6	0,8566	0,8459	0,9156	1,0545	1,0633				
7	1,0387	0,8238	0,3880	0,3058	0,3876	0,4508			
8	0,4628	0,3326	0,1621	0,2037	0,2123	0,3314	0,1154		
9	0,7738	0,6086	0,3135	0,2953	0,3457	0,3013	0,0256	0,0414	
10	0,0068	0,0472	0,4067	0,6954	0,5599	0,7466	1,0162	0,4467	0,7436

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

Assim como foi constatado na análise de componentes principais (Figura 5), na Figura 6 podemos também observar a nítida separação entre os clones tolerantes ao déficit hídrico (clone 1, 2 e 10), à esquerda no eixo da VC1 (variável canônica 1), sendo as variáveis CLOB e GLUT as mais relevantes no agrupamento desses três clones considerados tolerantes.

A proximidade no gráfico da Figura 6 e o baixo valor de dissimilaridade na Tabela 7 (0,0068), entre os clones 1 e 10, indica similaridade de comportamento entre os mesmos. Apesar de não serem clones da mesma espécie, esta similaridade pode estar relacionada à semelhança no mecanismo de tolerância ao déficit hídrico, em função do comportamento das variáveis aqui utilizadas para caracterizá-los.



**Figura 6** - Dispersão dos clones em função dos escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Como evidenciou a observação da Figura 6, a metodologia de análise por variáveis canônicas com exclusão de variáveis redundantes se mostrou tão eficiente quanto a análise por componentes principais para estas variáveis originais, pois ambas as metodologias conseguiram separar o grupo de clones tolerantes dos susceptíveis e grupo de clones da espécie *E. urograndes* dos clones híbridos entre *E. grandis* e *E. urophylla*. A separação dos grupos evidencia também que tanto os clones como as espécies possuem de particularidades de comportamento para as características avaliadas, que não variam muito dentro deles.

### **Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico)**

Na Tabela 9, estão apresentados, para a condição de crescimento sob déficit hídrico, os coeficientes de correlação entre as variáveis do grupo 1 (FOTOS, CONDU, FV/FM, POTHID, CLOA, CLOB, ANTOC e CAROT) originais e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis ( $U_i$ ) do grupo 1, bem como a correlação entre as variáveis originais do grupo 2 (CAT, POX, SOD, APX, GLUT, ASC, DASC, PEHID e ASCT) e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis ( $V_i$ ) do grupo 2.

**Tabela 9** - Correlação entre as variáveis originais de crescimento das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis originais (U<sub>i</sub>, V<sub>i</sub>).

Variável	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
<b>Grupo 1</b>							
<b>FOTOS</b>	0.02678	0.27942	0.23754	<u>-0.84805</u>	-0.07714	0.31966	0.13578
<b>CONDU</b>	0.0064	-0.18021	-0.03182	<u>-0.76223</u>	-0.3375	0.3892	-0.19847
<b>Fv/Fm</b>	-0.03449	0.14201	0.30648	<u>0.85643</u>	-0.19018	0.09925	0.28251
<b>POTHID</b>	0.21825	0.48268	-0.20995	<u>0.60169</u>	-0.16902	0.25577	-0.24088
<b>CLOA</b>	0.03605	0.28685	0.00836	<u>0.70265</u>	<u>-0.59087</u>	-0.22566	-0.04379
<b>CLOB</b>	0.04468	0.28104	-0.05522	<u>0.69368</u>	<u>-0.61594</u>	-0.22427	0.05923
<b>ANTOC</b>	-0.01833	0.12165	0.26573	<u>-0.50998</u>	0.20677	0.43294	0.10479
<b>CAROT</b>	0.06292	0.27813	0.04454	<u>0.65757</u>	<u>-0.62048</u>	-0.27889	-0.05527
Variável	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
<b>Grupo 2</b>							
<b>CAT</b>	0.08554	-0.00009	0.18286	0.19798	<u>0.80016</u>	0.02511	<u>0.52687</u>
<b>POX</b>	0.42439	-0.3051	0.38464	-0.11252	-0.47909	-0.29696	0.35326
<b>SOD</b>	0.24728	-0.09381	0.41883	<u>-0.57134</u>	-0.42821	0.04339	0.49074
<b>APX</b>	0.0695	-0.11872	0.17037	<u>-0.76069</u>	-0.13038	0.40284	0.43061
<b>GLUT</b>	0.3574	-0.23539	0.14376	-0.11328	<u>0.85004</u>	0.01885	-0.20306
<b>ASC</b>	-0.14139	0.1627	-0.18359	0.946	-0.06376	0.07392	0.11887
<b>DASC</b>	0.07396	0.31194	-0.02845	<u>-0.63458</u>	0.00368	0.49571	0.14636
<b>PEHID</b>	-0.07237	0.20447	-0.02256	<u>-0.78806</u>	-0.08623	0.25859	<u>0.5007</u>
<b>ASCT</b>	-0.11004	0.41806	-0.23319	<u>0.62563</u>	-0.07107	0.45241	0.24581

Valores sublinhados referem-se a correlações significativas a 5% e representam as variáveis que predominaram na explicação da variância total

Com base nos pares canônicos apresentados na Tabela 9, observa-se que nenhuma correlação foi significativa para os pares canônicos U<sub>1</sub>,V<sub>1</sub>; U<sub>2</sub>,V<sub>2</sub>; U<sub>3</sub>,V<sub>3</sub> e U<sub>6</sub>,V<sub>6</sub>, para o grupo 1 e o grupo 2. No quarto par canônico, houve alta correlação para todas as variáveis para o grupo 1 e alta correlação para SOD, APX, DASC, PEHID e ASCT para o grupo 2. No quinto par canônico (U<sub>5</sub>,V<sub>5</sub>), para o grupo 1 foram significativas as correlações com as variáveis originais CLOA, CLOB e CAROT; e para o grupo 2, CAT e GLUT. No sétimo par canônico (U<sub>7</sub>,V<sub>7</sub>), houve alta correlação somente para o grupo 2 de variáveis originais, sendo elas: CAT e PEHID.

## **Conclusões**

Os três clones sabidamente tolerantes (10 UC, 2 TC e 1 CL) têm relação direta com as variáveis, ascorbato/desidroascorbato, ascorbato e anion superóxido, e relação inversa com a variável peróxido e SOD. Relações estas, esperadas para um mecanismo de tolerância a déficit hídrico.

Considerando apenas os dois primeiros clones mais tolerantes em campo (10 UC e 2 TC), foi observada uma relação direta com clorofila A, clorofila B, clorofila Total, carotenoide, ascorbato/desidroascorbato, ascorbato, ânion superóxido e potencial hídrico, e inversa com SOD e antocianina. O que torna essas características, fortes candidatas para serem utilizadas em um programa de melhoramento genético, para identificação de eucaliptos tolerantes a déficit hídrico.

Para o agrupamento de clones tolerantes a déficit hídrico, levando-se em consideração as variáveis deste estudo, o método que mais se aproximou em apresentar resultado similar ao que se observa em campo, em plantios comerciais, foi o agrupamento via análise das variáveis canônicas. Por meio desta análise, interpretamos que as variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram FOTOS, FV/FM, CLOA, CLOB e GLUT, o que foi confirmado na análise de correlações canônicas, onde as mesmas variáveis tiveram altas correlações no par canônico (U4, V4).

## Referências

Abbasi AR, Sarvestani R, Mohammadi B, Baghery A (2014) Drought stress-induced changes at physiological and biochemical levels in some common vetch (*Vicia sativa* L.) genotypes. *J Agric Sci Tech* 16:505-516

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1985) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol* 109: 1247-1257

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecol* 102:425-432

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), pp.205-207.

Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the *Biophys Acta* 990: 87-92

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol* 349: 280-287

Cassel DK, Nielsen DR (1986) Field capacity and available water capacity. In: KLUTTE A. *Methods of soil analysis*. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2.ed. Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of Agronomy, 901-926.

Chance, B, and A. C. Maehly. (1955) Assay of catalases and peroxidases. (1955): 764-775.

Cruz CD (2013) GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:271-276

DaCosta M, Huang B (2007) Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for bentgrass species in responses to drought stress. *J. Am. Soc. Hortic. Sci* 132:319-326

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron Sustain Dev* 29:185-212

Garcia-Plazaola JI, Faria T, Abadia J, Abadia A, Chaves MM, Pereira JS (1997) Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany* 48:1667-1674

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87-92

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 1977 59: 309–314

Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84: 450-455

Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207(4), pp.604-611.

Huang CJ, Zhao SY, Wang LC, Anjum SA, Chen M, Zhou HF, Zou CM (2013) Iteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. *Aust. J Crop Sci* 7:594-599

Iizumi T, Ramankutty N (2015) How do weather and climate cropping area and intensity? *Glob Food Sec* 4: 46-50

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório 2017. São Paulo, 2017. 2-77p.

Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ (2009) Somasundaram, R., Panneerselvam, R. Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal Agricultural Biology* 11:100-105

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D (1995) Extraction and Determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem* 225: 165-167 Kaur G, Asthir B (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol Plant* 59: 609-619

Khoyerdı FF, Shamshiri MH, Estaji A (2016) Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Sci Horti* 198:44-51

Koffler BE, Bloem E, Zellnig G, Zechmann B (2013) High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of Arabidopsis. *Micron* 45:119-128

Koffler BE, Luschin-Ebengreuth N, Maria Müller M, Stabentheiner E, Zechmann B (2014) Compartment specific response of antioxidants to drought stress in Arabidopsis. *Plant Science*, 227:133-144

Kuo e Kao, 2003).

Larcher W *Physiological plant ecology*. 3.ed. New York, 1995. 506p.

Lesk C, Rowhani P, Ramankutty N (2016) Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature* 7;529 (7584): 84-7

McKiernan AB, Potts BM, Hovenden MJ, Brodribb TJ, Davies NW, Rodemann T, McAdam SAM, O'Reilly-Wapstra JM (2017) A water availability gradient reveals the deficit level required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. *Annals of Botany* 119:1043-1052

Medrano H, Tomás M, Martorell S et al. (2002) From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: limitations of leaf WUE as a selection target. *Crop J* 3:220–228

Mibei EK, Ambuko J, Giovannoni JJ, Onyango AN, Owino WO (2017) Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Sci Nutr* 5:113-122

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33:453-467

Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J Biol Chem* 246: 6886-6890

Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J Plant Physiol* 158: 1023-1029

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880

Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R. and Moreira, M.A., 1999. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(3), pp.137-143.

Polle A, Rennenberg H (1992) Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II. Defense systems against oxidative stress in needles. *New Phytology* 121:635-640

Queiroz CGS, Alonso A, Mares-Guia M, Magalhães AC (1998) Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biology Plant* 41:403-413

Rubio MC, Gonzalez EM, Minchin FR, Webb KJ, Arrese- Igor C, Ramos J, Becana M (2002) Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum* 115: 531-540

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-345

Sgherri CLM, Maffei M, Navari-Izzo F (2000) Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *Journal of Plant Physiology* 157:273-279

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M., (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.

Shvaleva AL, Costa F, Silva E, Breia E, Jouve L, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM (2005) Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity *Tree Physiology* 26:239-248

Smirnoff N (1998) Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9:214-219

Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144: 307-313

## CAPÍTULO 3

### Síntese de metabólitos em eucalipto sob déficit hídrico

#### Introdução

A eucaliptocultura possui importância mundial devido à grande adaptabilidade do gênero em vários ambientes. Os produtos advindos de suas folhas e caules são usados amplamente, como: óleos essenciais, madeira para construção civil, móveis, carvão, entre outros. Para a produção de tantos materiais importantes, comercialmente é necessário uma grande área plantada ou uma grande produtividade (IBA 2017), o que não é interessante economicamente. Dessa forma, busca-se sempre maior produtividade, mas são muitos estresses bióticos e abióticos que reduzem a produtividade do eucalipto, dentre os quais, o déficit hídrico é o maior limitador da produção vegetal (Ferreira et al. 2017).

As diversas espécies possuem diferentes formas de adaptação ao déficit hídrico, algumas buscam o escape através do florescimento precoce, outras reduzem a transpiração e outras aumentam a absorção de água (Mizutani e Kanaoka 2017). Para que todas essas adaptações sejam possíveis, a produção de alguns agentes químicos são essenciais como, por exemplo, citocininas e ácido abscísico. Esses sinalizadores possuem grande importância no ajuste estomático e, por consequência, na redução de água perdida por transpiração (Chung et al. 2018). Alguns agentes químicos podem, também, funcionar como solutos osmoticamente ativos, como por exemplo, os açúcares e prolina, que reduzem o potencial hídrico celular da planta aumentando a possibilidade de absorção de água, mesmo quando existe pouca água disponível no solo (Nolan et al. 2017). Dessa forma, o presente estudo busca avaliar as alterações bioquímicas na síntese de compostos relacionados à tolerância ao déficit hídrico em 10 clones comerciais de Eucalipto.

## **Materiais e métodos**

### **Material vegetal**

Dez clones comerciais, sendo cinco selecionados na região Nordeste de Minas Gerais (1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR) e cinco selecionados na região Norte da Bahia (6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC) (Tabela 1), os quais foram obtidos a partir do cruzamento das espécies representadas na Tabela 2. As mudas desses clones foram selecionadas visualmente quanto à uniformidade de desenvolvimento e sanidade, após foram cultivadas em vasos plásticos, cobertos por saco plástico para impermeabilizar o vaso, com volume de cinco litros contendo solo peneirado de textura média (Tabela 2) e adubado com 10 g de Osmocote® de formulação NPK 19-6-10, com 3 repetições, e mantidos em viveiro de mudas coberto do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil no período entre 01/12/2015 a 08/04/2016.

**Tabela 1** - Identificação de clones comerciais.

<b>Código</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Tolerância observada em campo</b>	<b>Grau de tolerância (observações de campo)</b>	<b>1º LOCAL DE SELEÇÃO</b>
1CL	<i>E.cloeziana</i>	Tolerância	6	Itamarandiba - MG
2TC	1/2 <i>C. torelliana</i> ; 1/2 <i>C. citriodora</i>	Tolerância	8	Periquito -MG
3UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	4	Itamarandiba - MG
4UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
5UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
6GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	2	Entre Rios - BA
7GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
8GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
9GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Entre Rios - BA
10UC	1/2 <i>E.camaldulensis</i> ; 1/2 <i>E.grandis</i>	Tolerante	10	Biritinga - BA

**Tabela 2** - Caracterização climática do ambiente natural de origem das espécies utilizadas no cruzamento para formação dos clones testados.

<b>Espécies</b>	<b>Clima</b>	<b>Precipitação (mm)</b>	<b>Altitude (m)</b>	<b>Temperatura média max. (°C)</b>
<i>C. torelliana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.cloeziana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	40-100	29-34
<i>E.urophylla</i>	Temperada, tropical e subtropical	1500-2800	200-1200	27-36
<i>C. citriodora</i>	Temperada, tropical e subtropical	800-1200	0-1200	27-39
<i>E.grandis</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E.camaldulensis</i>	Deserto, temperado, equatorial, tropical e subtropical	150-1100	20-700	26-39

**Tabela 3** - Características físicas e químicas do Latossolo Vermelho + 30% de areia.

Análise granulométrica (kg.kg <sup>-1</sup> )												
Areia	Silte		Argila			Classe textura	Equivalente em umidade (Kg Kg <sup>-1</sup> )					
0,632	0,123		0,181			Franco arenoso	0,18					
Análise química (cmol/dm <sup>3</sup> )												
pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	m	V	
H <sub>2</sub> O	...(mg/dm <sup>3</sup> )...		.....(cmol/dm <sup>3</sup> ).....									.....%.....
5,46	5,7	8	0,71	0,09	0,0	0,8	0,82	0,82	1,62	2	50,6	

\* Análise realizada no laboratório de análise de solos, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa.

A capacidade de campo do solo foi calculada através do método do equivalente de umidade (EU), em que amostras peneiradas de solos, ou seja, amostras deformadas de solo, previamente saturadas com água, foram centrifugadas a 1000 xg, durante 30 minutos, ao potencial de -33 kPa (Cassel e Nielsen, 1986), depois as amostras foram pesadas e levadas a estufa até atingirem massa seca constante. Foi considerada a capacidade de campo a quantidade de água que permaneceu no solo após a centrifugação, que calculado pela diferença entre o peso úmido do solo e o peso seco, passou a ser considerada a quantidade de água necessária para atingir 100% da capacidade de campo do solo.

As mudas foram irrigadas por três meses para adaptação ao substrato e ao ambiente e para simulação das condições de chuva em campo, com lâmina de água ideal para atingir 90% da capacidade de campo do solo (CC) e, após esse período, foram aplicados os tratamentos durante 40 dias, sendo 50% da capacidade de campo do solo (CC), simulando déficit hídrico, e 90% da CC, simulando irrigação ideal.

As variáveis de crescimento foram mensuradas logo após o plantio e no final do experimento. Após, foram coletadas amostras em folhas completamente expandidas posicionadas proporcionalmente nos mesmos pares de folhas em todos os clones e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e levadas para o ultra freezer e armazenados até o momento das análises. De acordo com Correia et al. (2014) as folhas são os melhores órgãos dos vegetais para se identificar características ligas ao déficit hídrico.

## **Análises de crescimento**

As variáveis de crescimento foram mensuradas no início do plantio e no final do experimento, com análises morfológicas de altura (cm), diâmetro de coleto (mm), número de folhas, área foliar (cm<sup>2</sup>), peso da folha, do caule e raiz.

## **Quantificação de fitohormônios**

Os hormônios foram extraídos, segundo metodologia descrita por Müller e Munné-Bosch (2011), com modificações. Foram adicionados 400 µL de solução extratora (metanol:isopropanol:ácido acético 20:79:1) em 20 mg de tecido foliar. Em seguida, as amostras foram agitadas por 20 segundos e, posteriormente, colocadas em banho de gelo por 30 minutos. Após centrifugação (13000 g, 10 min a 4°C), 350 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para novo tubo. Ao pellet resultante, repetiu-se o processo de extração e, em seguida, juntaram-se os dois sobrenadantes. Uma última centrifugação (20.000 g, 5 min a 4°C) foi realizada para remoção dos restos de tecido em suspensão e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O extrato obtido foi automaticamente injetado (5 µL) no sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series, acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. Uma curva de calibração (0,1 ng a 200 ng) utilizando os padrões de cada hormônio foi realizada para a obtenção da quantificação absoluta. Os dados gerados foram analisados no software “MassHunter Workstation” para obtenção da área dos picos de cada hormônio ABA , AS , Zeatina , JA , MeJa , AIA e ACC nas amostras e os resultados expressos em (ng g<sup>-1</sup>MF).

## **Extração etanólica para análises de metabólitos e proteínas solúveis**

Alíquotas de aproximadamente 10 mg de material vegetal liofilizado (folha) foram adicionadas a 250 µL de etanol 98%, incubadas por 20 min a 80 °C e posteriormente centrifugadas a 17.000 g por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e com o pellet resultante, outras duas extrações sequenciais foram realizadas, conforme descrito acima, porém utilizando 250 µL de etanol 80% e posteriormente, 50%. Os sobrenadantes obtidos com as extrações foram combinados e

utilizados na determinação de aminoácidos livres e açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose). O pellet resultante das extrações foi utilizado para a determinação das concentrações de amido e de proteínas solúveis.

### **Determinação da concentração de açúcares solúveis**

As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas segundo metodologia de Fernie et al. (2001). Aliquota de 10 µL de extrato etanólico foi adicionada em 60 µL de tampão HEPES/KOH 0,1 M pH 7,0, contendo MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 5 µL de ATP 60 mg/mL, 5 µL de NADP<sup>+</sup> 36 mg/mL e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH). Essa solução foi avaliada no comprimento de onda de 340 nm até estabilizar a OD (aprox. 30 min). Em seguida, foram adicionados, sucessivamente, 5 µL das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 40 min entre cada aplicação e 1 min de intervalo entre cada leitura.

Para estimar a concentração da glicose, frutose e sacarose, utilizou-se a seguinte equação, baseada na lei de Lambert-Beer “ $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$ ” e os resultados foram expressos em Sacarose ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS), glicose ( $\mu\text{mol de NADHP g}^{-1}$  MF) e frutose ( $\mu\text{mol de NADHP g}^{-1}$  MF).

### **Determinação da concentração de aminoácidos livres**

A concentração de aminoácidos livres foi avaliada conforme descrito por Gibon et al. (2004). Para a reação, foram combinados 10 µL do extrato etanólico, 40 µL de etanol 70%, 50 µL de tampão citrato pH 5,2 contendo ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 µL de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v). A reação foi incubada a 95 °C por 20 min no escuro e posteriormente lida no comprimento de onda de 570 nm. A concentração de aminoácidos livres nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de leucina e os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS. 2.7.2.

### **Determinação da concentração de açúcares solúveis**

As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas segundo metodologia de Fernie et al. (2001). Aliquota de 10 µL de extrato etanólico foi

adicionada em 60  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES/KOH 0,1 M pH 7,0, contendo  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 5  $\mu\text{L}$  de ATP 60 mg/mL, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NADP}^+$  36 mg/mL e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH). Essa solução foi avaliada no comprimento de onda de 340 nm até estabilizar a OD (aprox. 30 min). Em seguida, foram adicionados, sucessivamente, 5  $\mu\text{L}$  das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 40 min entre cada aplicação e 1 min de intervalo entre cada leitura. Para estimar a concentração da glicose, frutose e sacarose, utilizou-se a seguinte equação, baseada na lei de Lambert-Beer “ $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 \cdot 6,22)$ ” e os resultados foram expressos em ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ).

### **Determinação da concentração de proteínas solúveis totais**

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada segundo Gibon et al. (2004). O precipitado resultante da extração etanólica foi ressuscitado em 400  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1 M. As amostras foram incubadas por 1 h a 95 °C sob agitação e após, centrifugadas por 5 min a 14.000 g, sob temperatura de 4 °C. Uma alíquota de 3  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada a 180  $\mu\text{L}$  da solução do reagente de Bradford (Bradford, 1976) e, posteriormente, lida no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas solúveis nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos em ( $\text{mg g}^{-1} \text{MS}$ ).

### **Determinação da concentração de amido:**

A concentração de amido foi determinada no pellet resultante da extração etanólica, segundo Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o NaOH 0,1 M utilizado na quantificação de proteínas, foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de ácido acético 1 M, seguido de agitação. Uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  da suspensão foi combinada com 60  $\mu\text{L}$  do mix de hidrólise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -amilase (0,01 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ). As amostras foram incubadas por 1 h a 55 °C, sob agitação a 500 rpm. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  dessa reação foi combinada com 160  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES/KOH 0,1M pH 7,0, contendo  $\text{MgCl}_2$  3 mM, 5  $\mu\text{L}$  de ATP 60 mg mL<sup>-1</sup>, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NADP}^+$  36 mg mL<sup>-1</sup> e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato dependente de  $\text{NADP}^+$  (G6PDH). Essa nova reação foi lida no comprimento de onda de

340 nm até estabilização da densidade óptica (OD), momento em que foram adicionados 5 µL de hexocinase (2 unidades/reação). As leituras a 340 nm continuaram por mais 60 minutos, com 1 min de intervalo entre cada leitura. A concentração de amido foi estimada indiretamente pela quantidade de glicose resultante da sua degradação e os resultados calculados por meio da equação “ $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$ ” e expressos em ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$ ).

### **Determinação de prolina**

A determinação da concentração de prolina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shabnam (2016). Amostras de 100 mg de tecido foliar foram homogeneizadas em 1 mL de ácido sulfossalicílico 3% (p/v), seguido de centrifugação a 7.500 rpm por 10 min. Em seguida, foram coletados 100 µL do extrato e adicionados a 200 µL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético 17 glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6 M). As amostras foram incubadas por 1 h a 100°C e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em (mg mL<sup>-1</sup> MF).

### **Análise estatística**

Os experimentos foram realizados de acordo com um esquema fatorial 2x10 (2 capacidades de campo e 10 clones diferentes), com 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com uma planta. Foram avaliados dois percentuais da capacidade de campo do solo (CC), aplicados de acordo com a diferença de peso do sistema (vaso, solo, tutor e água) para atingir (50% e 90% CC) simulando, respectivamente déficit hídrico e irrigação ideal.

Em relação às variáveis foi feito teste de Normalidade Shapiro-Wilk, todas variáveis foram submetidas à ANOVA e estimativa dos parâmetros genéticos, obtidas utilizando software GENES/UFV no modelo fatorial simples:

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = m + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : valor fenotípico do caráter Y medido no material genético i, no ambiente j

m: média geral paramétrica dos dados em estudo

$G_i$ : efeito do  $i$ -ésimo genótipo

$B/A_{jk}$ : efeito de blocos dentro de ambiente

$A_j$ : efeito do  $j$ -ésimo ambiente experimental

$GA_{ij}$ : efeito da interação do  $i$ -ésimo genótipo com o  $j$ -ésimo ambiente

$E_{ijk}$ : erro médio associado à observação  $Y_{ijk}$

Considerando o efeito de genótipo como fixo e o efeito de ambiente aleatório.

Para a comparação entre as médias de cada clone, para cada variável, foi realizado o teste de média, Tukey (5% de probabilidade). O resultado foi apresentado em gráfico para cada variável, priorizando a disposição das barras conforme o ranqueamento dos clones para deficit hídrico, facilitando a visualização do comportamento susceptível e tolerante.

Para avaliação da importância dos caracteres na avaliação dos clones tolerantes ao déficit hídrico foi realizada uma análise multivariada de componentes principais, variáveis canônicas, dissimilaridade e correlações canônicas (Software GENES, Cruz 2013).

Algumas variáveis apresentadas no Capítulo1, foram analisadas novamente no Capítulo2, pois precisamos garantir que os clones selecionados como tolerantes sejam avaliados também quanto à produtividade dos mesmos.

## Resultados e discussão

### Análise univariada

Os clones 7 GU e 9 GU não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, porém, nos clones 1 CL, 2 TC, 3 UR, 6 GU e 10 UC, em resposta ao déficit hídrico, ocorreu aumento da concentração de ABA (Figura 2A), indicando que esses clones têm potencial em obter maior controle estomático em caso de déficit hídrico, conforme observado por Correia et al. (2014) em dois genótipos de *Eucalyptus globulus*. Segundo Sussmilch et al. (2017), a capacidade das plantas em responder à deficiência hídrica com aumento da concentração de ABA é uma vantagem competitiva para ambientes áridos. Os clones 1 CL e 10 UC, considerados tolerantes em campo, apresentaram significativo aumento da concentração de ABA sob déficit hídrico. Os clones 44 UR, 5 UR e 9 GU produziram mais ABA em condição de irrigação ideal do que quando sob déficit hídrico e os clones 7 GU e 8 GU não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Diferentes procedências e espécies de Eucalipto (*E. globulus* e *E. viminalis*) sob déficit hídrico obtiveram aumento na produção de ABA, de acordo com McKiernan et al. (2016).

Em resposta ao déficit hídrico ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos para os clones 1 CL, 3 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU e 10 UC, sendo que apenas nos clones 3 UR e 10 UC ocorreu aumento da concentração de (AS) quando em déficit hídrico (Figura 1B).

Os clones considerados tolerantes em campo 1 CL, 2 TC e 10 UC foram os que mais produziram zeatina, tanto sob condição de irrigação ideal como sob déficit hídrico, com maior produção, sob déficit hídrico, nos clones 1 CL, 2 TC, 3 UR, 6 GU, 8 GU, 9 GU e 10 UC (Figura 1C).

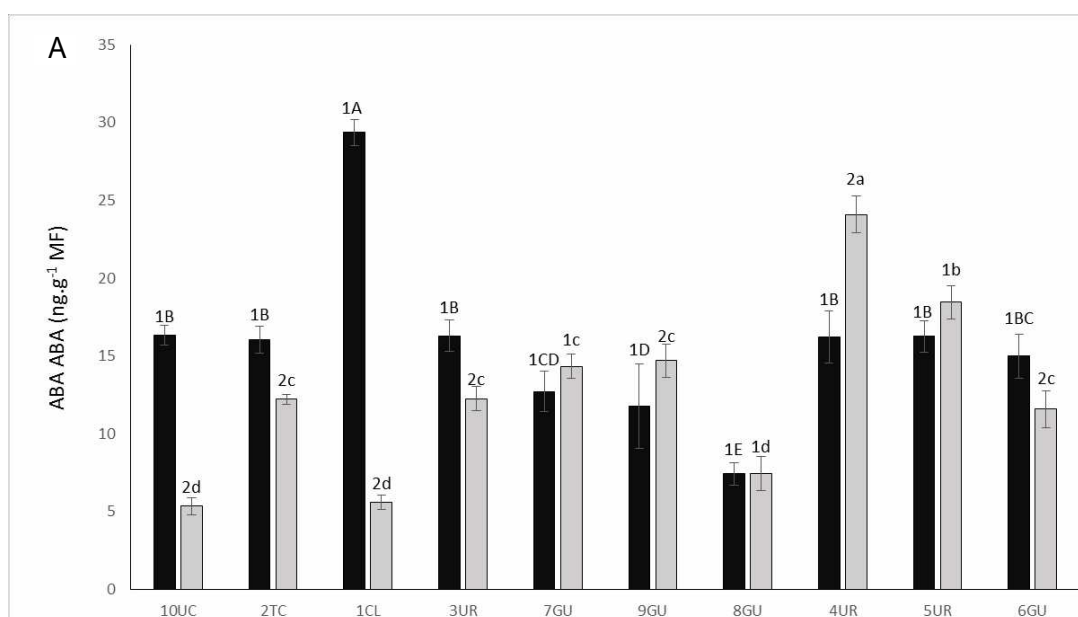
Os clones que responderam aumentando a concentração de jasmonato (JA), quando em déficit hídrico, foram 2 TC, 3 UR, 6 GU, 8 GU, 9 GU e 10 UC, sendo que o clone 10 UC foi o mais responsivo ao déficit hídrico, produzindo três vezes mais que em condição de irrigação ideal (Figura 1D). Correia et al. (2014) observaram redução na concentração de jasmonato para dois genótipos *E. globulus* sob déficit hídrico. No entanto, assim como descrito por Deuner et al., (2015), a rota metabólica octadecanoide, muito importante na defesa contra estresse abióticos, culmina com a produção do ácido jasmônico. Dessa maneira espera-se que clones que respondam mais rapidamente ao

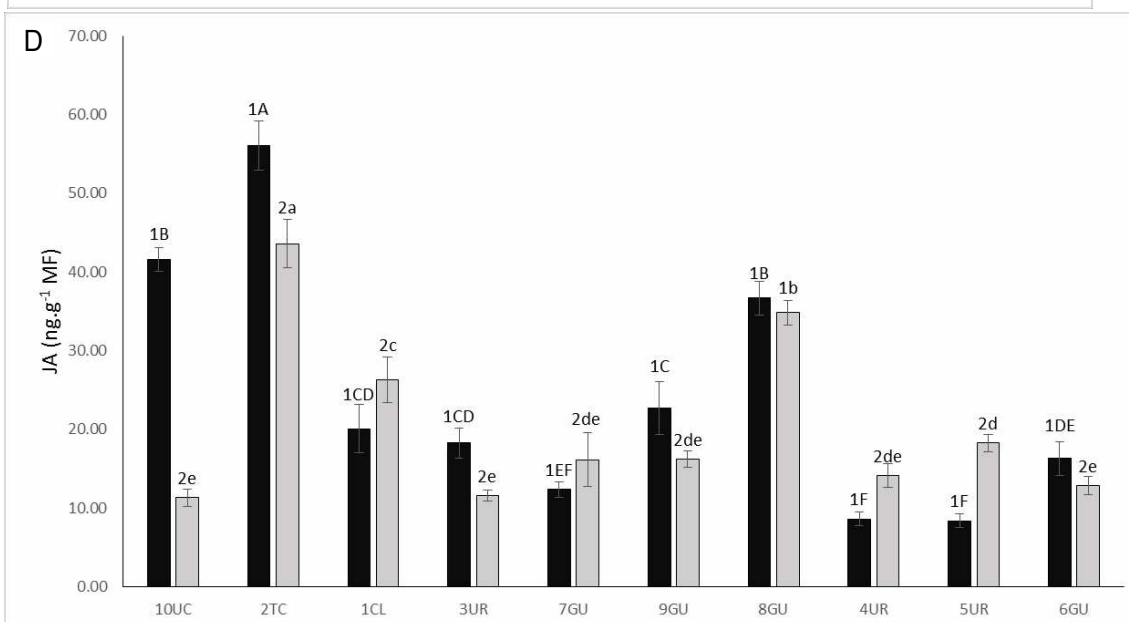
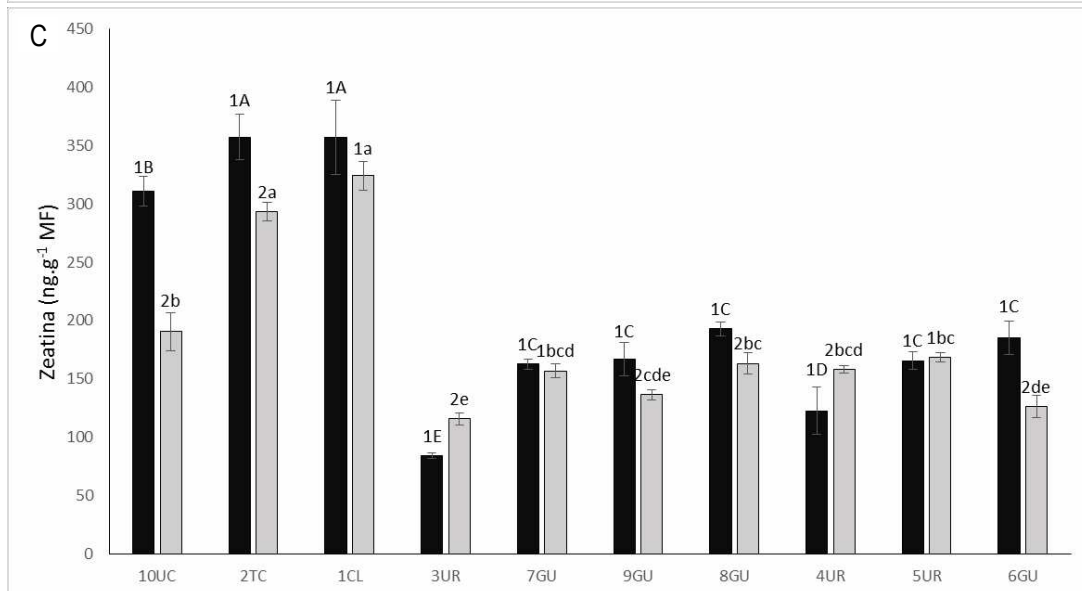
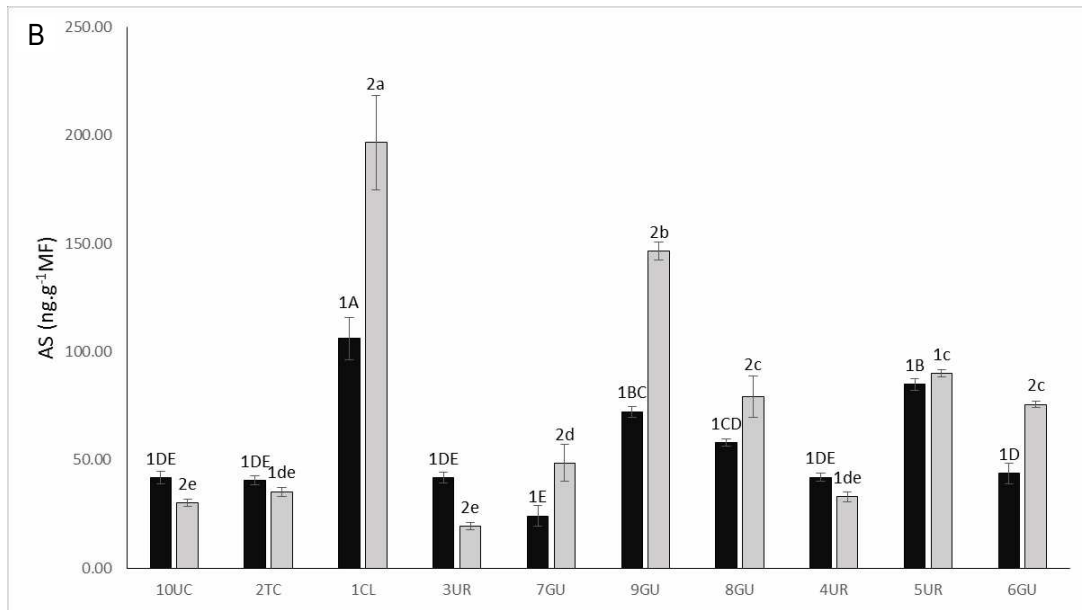
estresse tenham maior produção de ácido jasmônico, assim como ocorreu com o clone 10 UC, que produziu três vezes mais sob déficit hídrico do que quando irrigado adequadamente.

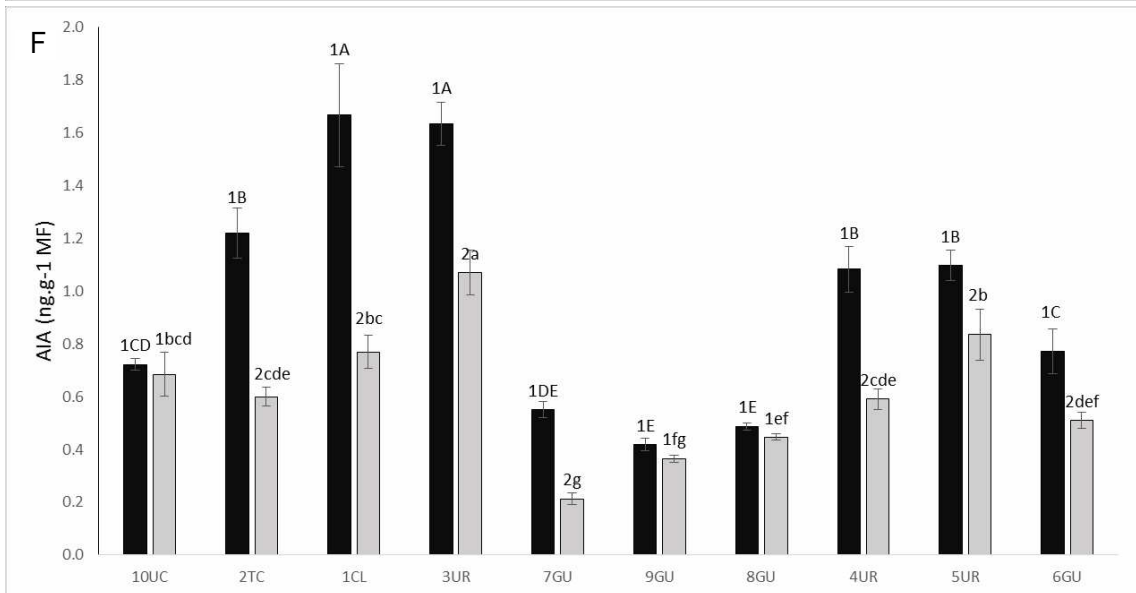
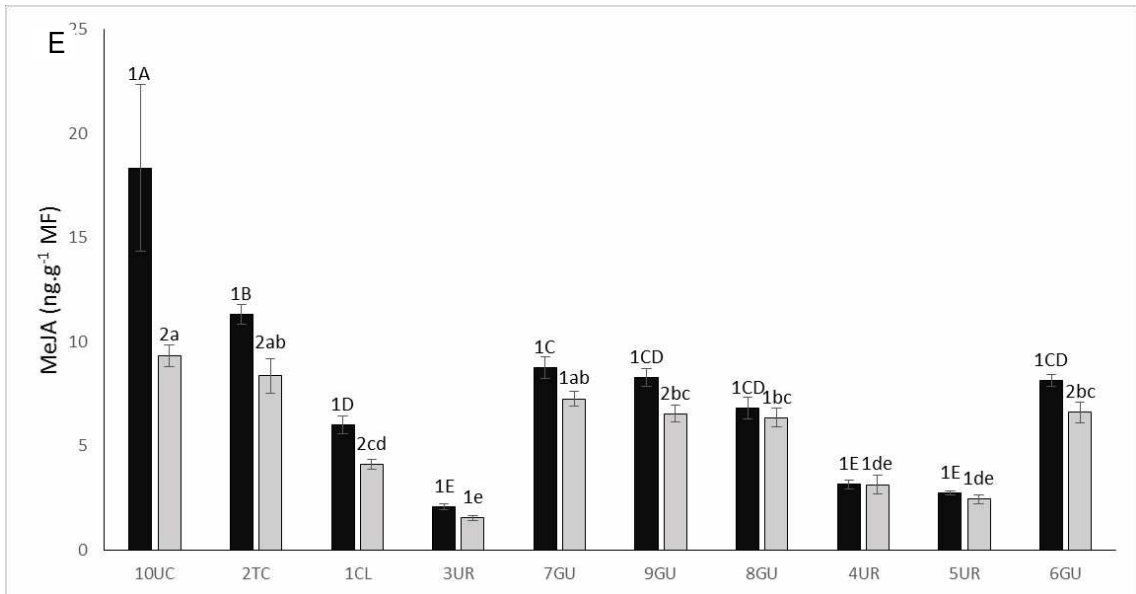
Analisando o metil jasmonato (MeJA), os clones mais responsivos sob déficit hídrico foram 1 CL, 2 TC, 6 GU, 9 GU e 10 UC. Os demais não tiveram diferença estatística para tratamento. Os clones que mais produziram MeJa foram os clones considerados tolerantes em campo: 2 TC e 10 UC (Figura 1E).

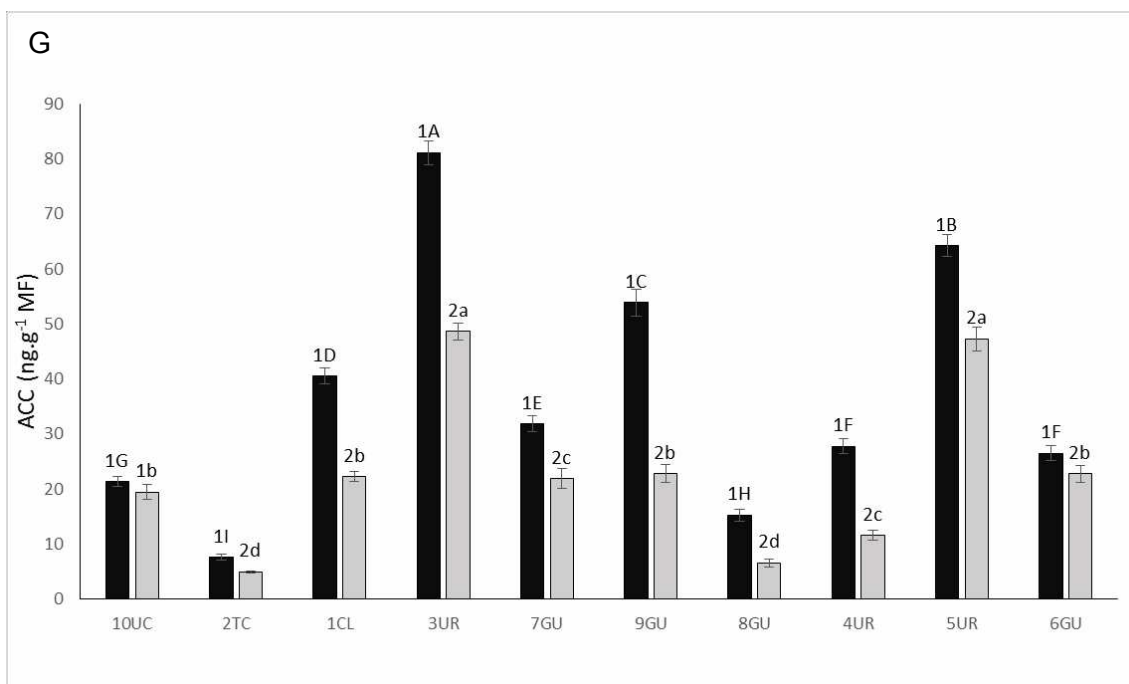
A produção de ácido indol acético (AIA) apresentou diferença estatística entre os tratamentos, e aumento da concentração em resposta ao déficit hídrico, para os clones 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU e 7 GU (Figura 1F).

O ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor do etileno, teve aumento da concentração em todos os clones sob déficit hídrico, à exceção do 10 UC, que não apresentou diferença estatística entre os tratamentos.









**Figura 1** - Concentrações de ABA (A), AS (B), Zeatina (C), JA (D), MeJa (E), AIA (F) e ACC (G) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

A concentração de amido (Figura 2A) foi maior para o tratamento com irrigação adequada na maioria dos clones testados, com exceção dos clones 3 UR e 8 GU, que também foram os únicos clones que não apresentaram diferença entre os tratamentos.

O tratamento déficit hídrico provocou aumento na concentração de sacarose (Figura 2B) em todos os clones, assim como encontrado por Merchant et al. (2006), em treze espécies de eucalipto sob déficit hídrico e por Cordeiro et al. (2017), em plantas de açaí. Somente os clones 3 UR e 9 GU não apresentaram diferença entre os tratamentos. Os clones 1 CL, 2 TC, 6 GU e 8 GU produziram cerca de duas vezes mais sacarose quando submetidos ao déficit hídrico.

O tratamento déficit hídrico estimulou o aumento na concentração de glicose (Figura 2C) para todos os clones, à exceção do clone 5 UR, sendo os clones 9 GU e 10 UC os que mais acumularam glicose. O clone 10 UC foi o que menos produziu glicose em irrigação ideal e um dos que mais produziu com déficit hídrico, indicando ser uma nítida reação para tolerância ao déficit hídrico. O clone 2 TC, apesar de ter produzido

mais sob a condição de déficit hídrico do que em irrigação ideal, manteve-se no ranqueamento para os tratamentos ficando praticamente na última posição.

De acordo com Merchant et al. (2006), em estudo com 13 espécies de Eucalipto, o comportamento das espécies sob déficit hídrico não segue um padrão quanto a concentração de glicose.

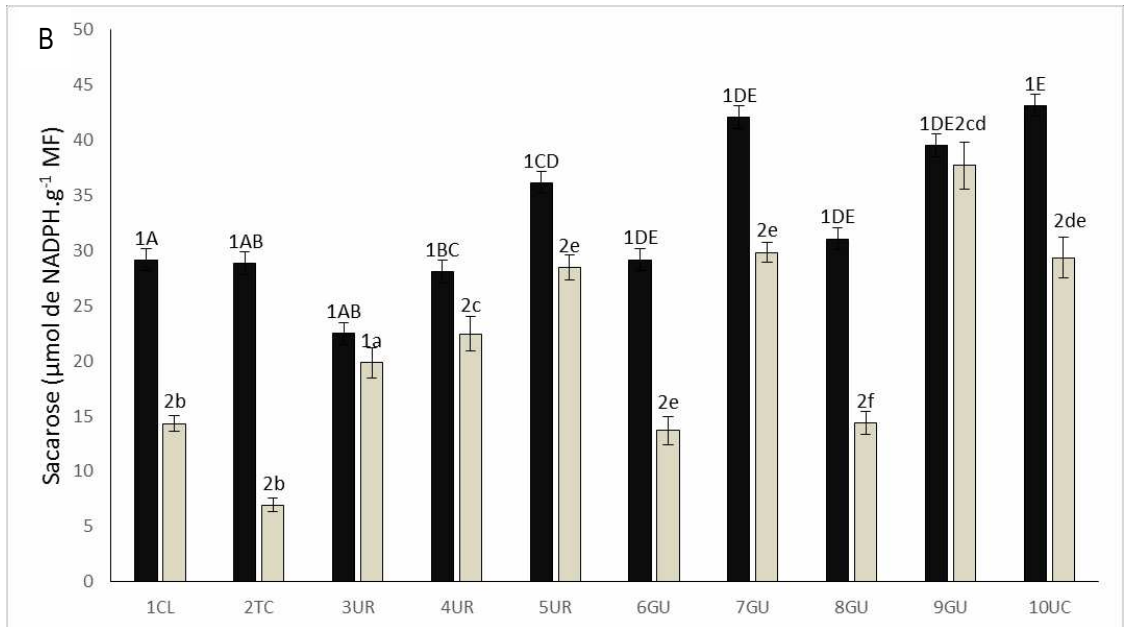
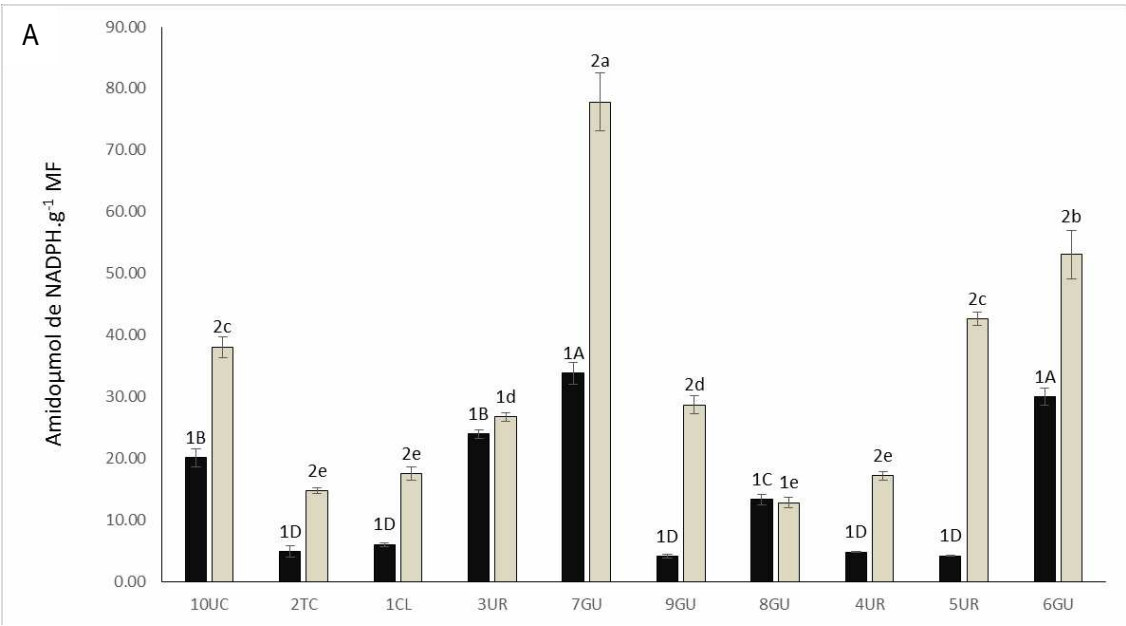
Para a variável frutose (Figura 2D), todos os clones aumentaram a produção quando submetidos ao déficit hídrico e somente o clone 5 UR não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O clone 10 UC foi o que mais produziu frutose sob déficit hídrico e o que menos produziu com irrigação ideal, indicando resposta ao déficit hídrico. O clone 2 TC foi o clone que menos produziu frutose nos dois tratamentos.

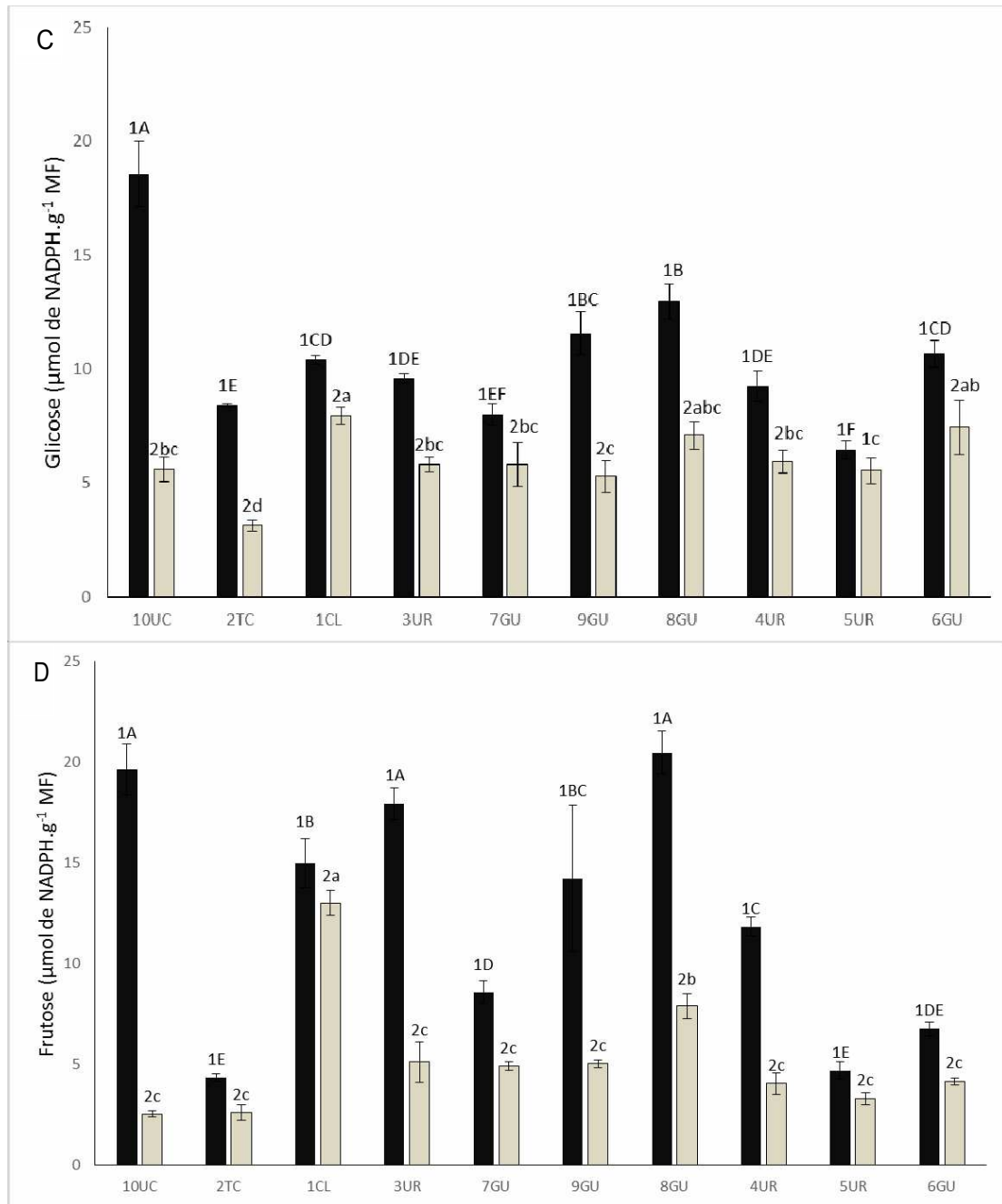
Ocorreu maior produção de aminoácidos (Figura 2E) em todos os clones sob déficit hídrico, com diferença estatística entre os tratamentos. Os clones 4 UR e 6 GU apresentaram o dobro da concentração em comparação com o tratamento irrigação ideal. Entretanto, o clone 10 UC apresentou o maior acúmulo de aminoácidos, nos dois tratamentos.

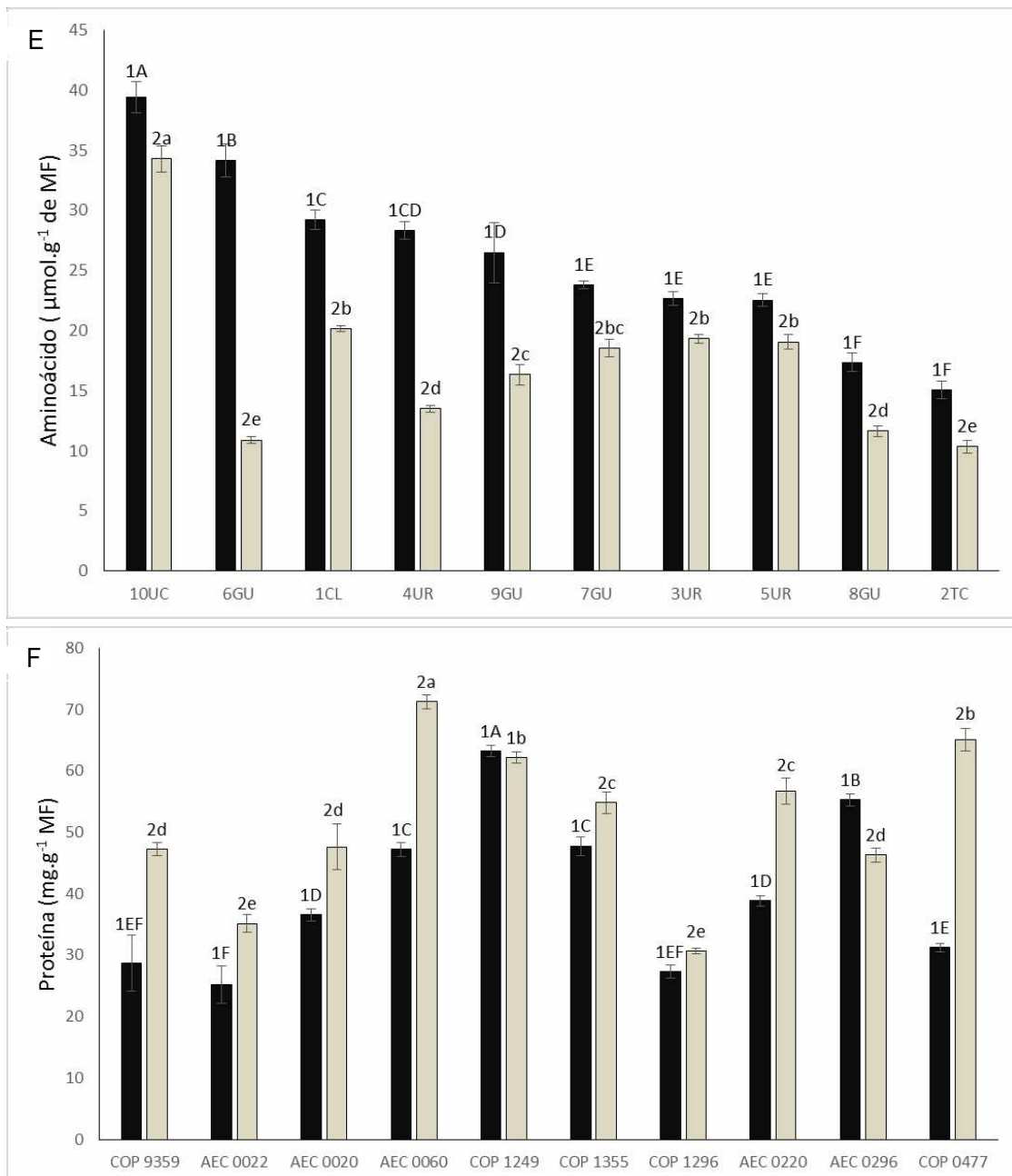
Os clones 5 UR e 7 GU foram os únicos que produziram mais proteínas (Figura 2F) sob déficit hídrico e, somente o 7 GU, não apresentou diferença entre os tratamentos. O clone 1 CL não mudou de posição no ranqueamento para os dois tratamentos, enquanto os clones 10 UC e 2 TC produziram menos proteína nos dois tratamentos.

Pode-se observar que, na maioria dos clones testados, quando submetidos ao déficit hídrico, a concentração de glicose, fruto, sacarose e aminoácidos aumentaram nas folhas (Figura 2A,B,C). A concentração de glicose foi maior no clone considerado tolerante em campo, 10 UC, e diferente estatisticamente do controle, produzindo aproximadamente, 3,5 vezes mais glicose que o controle.

Segundo Echevarria-Zomeno et al. (2009) e Cordeiro et al. (2017) as plantas podem acumular açúcares como um osmólito, fonte de energia para recuperação do crescimento ou como fonte de energia para desenvolver mecanismos de tolerância ao déficit hídrico, a depender do grau de déficit.







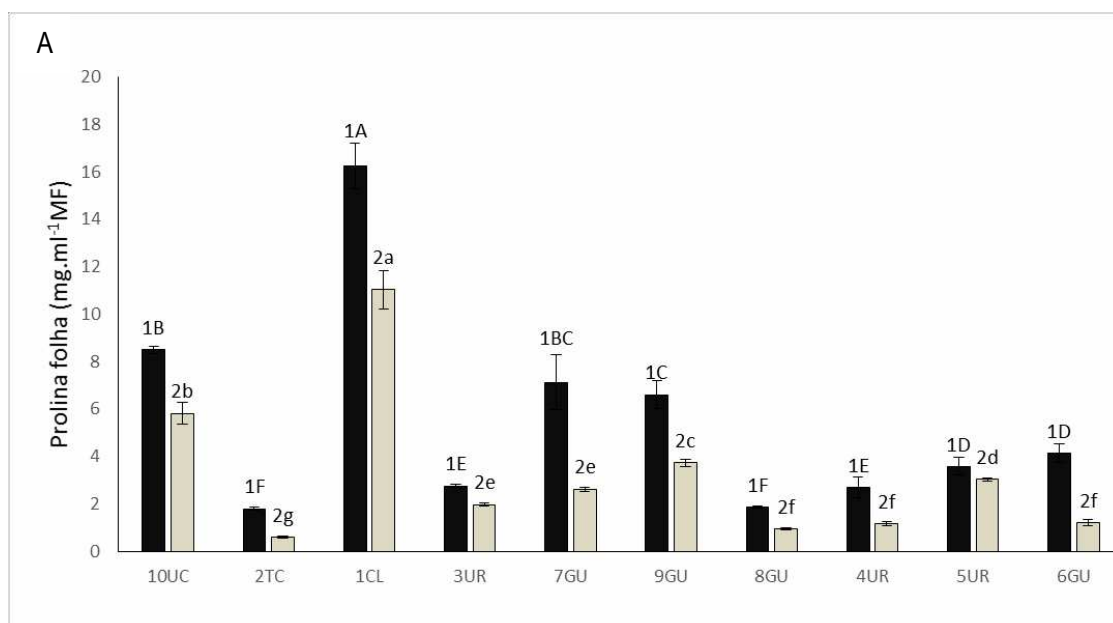
**Figura 2** - Concentrações de amido (A), sacarose (B), glicose (C), frutose (D), aminoácidos (E) e proteínas (F) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%)  controle (CC 90%)  Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

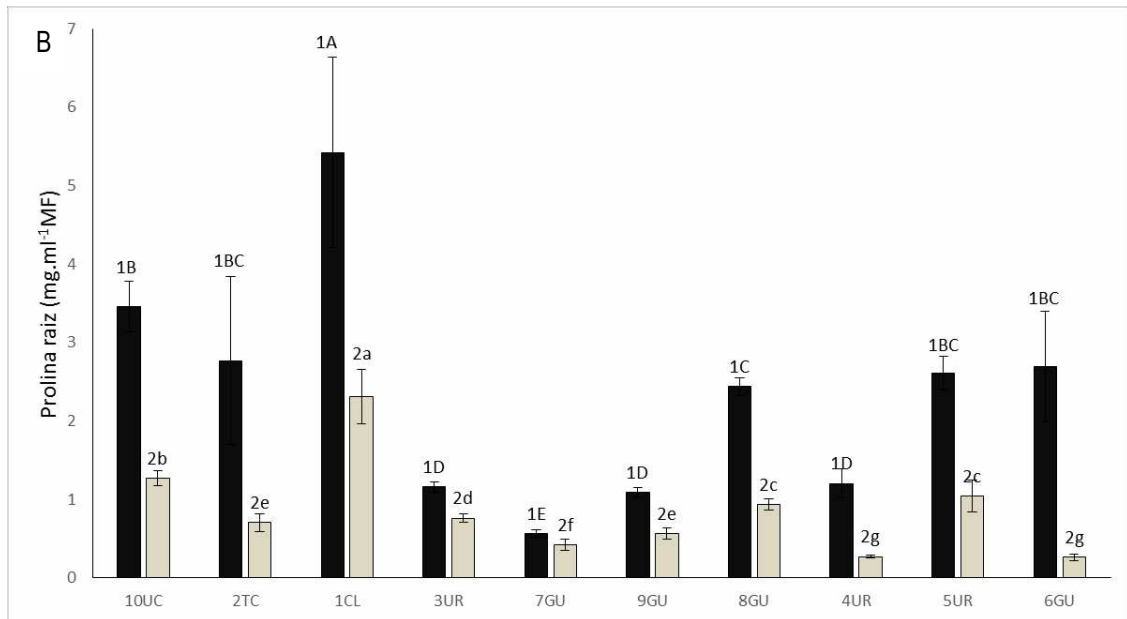
Segundo Gimeno et al. (2018), se for aumentado o fornecimento de 40% de CO<sub>2</sub> em florestas adultas de Eucalipto, com fornecimento limitado de água, a floresta não responde, reduzindo o uso da água ou aumento o crescimento. Logo, não seria solução

para o problema de déficit hídrico o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> para florestas adultas. No entanto, para florestas recém-plantadas eles observaram que, pode-se ter aumento da produção de açúcares.

O teor de prolina aumentou em todos os clones, tanto nas folhas como nas raízes (Figura 3 A e B), em situação de déficit hídrico, com as maiores diferenças observadas nas raízes. O clone 6 GU apresentou o maior acréscimo percentual na concentração de prolina em resposta ao déficit hídrico, sendo dez vezes maior do que a observada em condição ideal de irrigação. Segundo Merchant et al. (2006), as concentrações de osmólitos foram maiores nas treze espécies de Eucalipto testadas quando sob déficit hídrico, assim como a concentração de prolina foi maior para todos os clones testados. Em outras espécies esse comportamento é também observado conforme demonstrado por Cordeiro et al. (2017) em plantas de açaí.

Resultados apresentados por Merchant et al. (2007) em seis espécies de eucalipto (*E. obliqua*, *E. rubida*, *E. camaldulensis*, *E. cladocalyx*, *E. polyanthemos* e *E. tricarpa*) demonstram que o ajuste osmótico, sob déficit hídrico, é uma variável na definição de diferenças estatísticas entre as espécies e clones, assim como o ambiente de origem.





**Figura 3** - Concentração de prolina na folha (A), concentração de prolina na raiz (B) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) ■ e controle (CC 90%) □. Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

O clone 10 UC é fruto do cruzamento entre *E. camaldulensis* que, de acordo com sua origem Australiana, vem de regiões que, naturalmente, seleciona indivíduos com maior tolerância ao déficit hídrico. De acordo com Blum (2016) o ajuste osmótico, promovido pelo aumento da concentração de açúcares, prolina e outros osmorreguladores e protetores, garante que as espécies mantenham a maior produtividade em comparação com aquelas que não o fazem.

## Análise Multivariada

### Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico)

Na Tabela 4 encontram-se os autovetores e a contribuição das variáveis originais nas duas primeiras componentes principais, bem como a variância explicada por essas variáveis latentes. Observa-se que as três primeiras componentes principais apresentam os maiores autovalores e explicaram 68% da variância total dos dados.

Analisando-se a primeira componente principal observa-se que os maiores autovetores positivos são relativos a INCDIAM, INCVOL, ZEATI, JASM, MEJA e GLICO. Os autovetores negativos mais significativos referem-se a ACC e PROTE. Logo, quanto maior for o valor desses componentes (escore) maior o número de variáveis com intereção significativa estaram sendo beneficiadas na componente principal 1.

Para a componente principal 2, observam-se autovetores negativos e significativos apenas referentes às variáveis: INCDIAM, AMIDO e PROTE. Para as variáveis INCALT, ABA, ACSA, ZEATI, AIA, PROFO E PRORA, foram obtidos autovetores positivos e com elevada contribuição nessa componente principal. Logo, como valores positivos significativos contemplam maior quantidade de variáveis, quanto maiores os escores dessa componente principal maior será a contribuição dessas variáveis com autovetores positivos.

Como utilizando somente as componentes principal 1 e 2 teríamos somente 53,87% da variação explicada, optou-se por introduzirmos também a componente principal 3, por ter uma contribuição significativa (14,64%) e por três variáveis ainda possibilitar facilidade na interpretação gráfica. Assim, para a componente principal 3 temos a seguinte observação: as variáveis ABA, ACSA, ACC, AMINO, PROTE, SACA e PROFO apresentaram valores positivos significativos e somente as variáveis INCALT e JASM apresentaram valores negativos significativos. Assim, o ideal são valores maiores de escores para essa componente principal 3.

Diante dos autovetores obtidos, pode-se afirmar que as três primeiras componentes principais reúnem uma grande quantidade de características que podem ser relevantes para a seleção de clones de eucalipto para a produção em áreas com limitações hídricas. Nota-se que, com exceção da variável FRUTO, todas as outras variáveis têm importância significativa em pelo menos um dos três componentes (CP1, CP2 e CP3), sendo que no componente principal 1, as duas maiores contribuições vêm das variáveis MEJA e GLICO, e para a componente principal 2, das variáveis ABA e PRORA, e para a componente principal 3, das variáveis PROFO e AMINO.

**Tabela 4 - Autovetores nas três primeiras componentes principais.**

Variáveis Originais	Autovetores		
	Componente 1	Componente 2	Componente 3
INCALT	0,1836	0,2029	-0,2228
INCDIAM	0,2853	-0,2465	0,1478

INCVOL	0,3151	-0,1759	0,0914
ABA	-0,0287	0,4026	0,2117
ACSA	-0,1132	0,3194	0,2262
ZEATI	0,2939	0,3097	-0,0664
JASM	0,3056	0,0988	-0,3637
MEJA	0,4188	-0,0161	0,0118
AIA	-0,1874	0,3521	-0,0609
ACC	-0,3141	0,0071	0,2524
GLICO	0,3202	0,0205	0,1249
FRUTO	0,1033	0,0224	0,1497
AMINO	0,1569	0,0505	0,3986
PROTE	-0,2318	-0,2035	0,3141
SACA	0,2192	-0,1851	0,2998
AMIDO	0,0874	-0,2542	0,1572
PROFO	0,1295	0,2519	0,4491
PRORA	0,1376	0,4075	0,0902
<b>Autovalores</b>	<b>5,23</b>	<b>4,47</b>	<b>2,64</b>
<b>Variância explicada</b>	<b>29,04</b>	<b>24,83</b>	<b>14,64</b>
<b>Variância explicada acumulada</b>	<b>29,04</b>	<b>53,87</b>	<b>68,51</b>

A Tabela 5 apresenta a matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das três primeiras componentes principais, para as variáveis avaliadas.

**Tabela 5** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das três primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	1,203								
3	0,673	0,739							
4	0,636	0,533	0,022						
5	0,541	1,008	0,035	0,094					
6	0,542	0,568	0,207	0,118	0,284				
7	1,014	1,184	0,486	0,409	0,557	0,158			
8	0,857	0,284	0,252	0,128	0,425	0,079	0,324		
9	0,577	0,868	0,269	0,202	0,308	0,032	0,070	0,195	
10	0,571	0,848	0,942	0,736	1,012	0,294	0,452	0,462	0,313

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

A dispersão dos clones de eucalipto (considerando os clones do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*) em função dos escores, diagrama de ordenação dos autovetores das duas primeiras componentes principais, pode ser visualizada na Figura 4, em um

plano com duas dimensões (2D). Como o plano 2D permite visualizar apenas 53,87% da variação explicada, faz-se necessário utilizar a terceira componente principal, passando a explicar 68,51% da variação, o que pode ser observado na Figura 5, em um plano 3D.

Avaliando a Figura 4, podemos observar um distanciamento no gráfico, em relação à maioria dos clones pelos clone 1 e 10, que são sabidamente tolerantes a déficit hídrico em condição de campo, nos plantios comerciais no Nordeste da Bahia. Neste gráfico, podemos observar o clone 1 (1 CL *E. cloeziana*) distante dos demais ocupando o topo do gráfico, sendo fortemente influenciado pela componente principal 2 e pelas variáveis ABA e PRORA. O clone 10 (10 UC, híbrido de *E. urophylla* com *E. camaldulensis*), se posiciona distante dos demais clones na lateral direita, estando sob forte influência da componente 1 e pelas variáveis MEJA e JASM. Essa diferença de posicionamento dos clones mais tolerantes ao déficit hídrico no gráfico 2, por estar sob influência de diferentes variáveis, sugere mecanismos diferentes de tolerância para estes dois materiais genéticos pertencentes a espécies distintas do gênero eucalyptus.

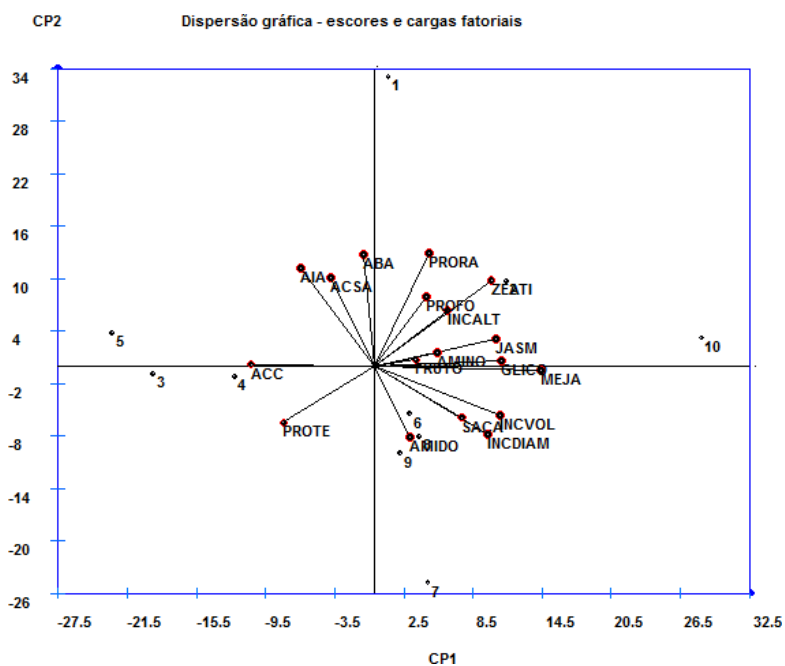
Avaliando a Figura 5 podemos observar que, além dos clones 1 e 10, podemos também separar o clone 2, que também é considerado tolerante ao déficit hídrico na região Nordeste da Bahia. Nesta Figura temos a inserção da componente principal 3, porém, são as componentes principais 1 e 2 que mais influenciaram na separação deste clone do restante do grupo de clones não tolerantes. No plano 2d da Figura 4 este clone encontra-se separado do grupo de clones susceptíveis, no quadrante superior direito, onde também se posicionam os clones 1 e 10. E nesta Figura ele apresenta um posicionamento que sugere forte influência da variável ZEATI, em um ângulo que indica influência de mesma magnitude entre as componentes 1 e 2, conforme apresentado na Tabela 4 (0,29 e 0,30).

A proximidade no gráfico da Figura 4 e o baixo valor de dissimilaridade na Tabela 5 (0,022), para o valor do quadrado da distância euclidiana, entre os clones 3 e 4, e 0,032 entre os clones 6 e 9 indica similaridade de comportamento entre os mesmos. Essa similaridade é confirmada quando nos atentamos para o fato de que são pares de mesma espécie, em que o clone 3 (3 UR) e clone 4 (4 UR) são materiais genéticos de *E. urophylla* e o clone 6 (6 GU) e clone 9 (9 GU) híbridos de *E. grandis* com *E. urophylla*. Outro fato que reforça a proximidade entre os clones é que os clones 3 e 4 referem-se a materiais genéticos selecionados pela empresa Aperam em Itamarandiba-MG

(precipitação média anual de 1200 mm) e os clones 6 e 9 foram selecionados na região do litoral norte da Bahia pela empresa Copener (precipitação média anual de 900 mm).

A Figura 4 apresenta grande separação entre o grupo de espécies por meio das duas primeiras componentes principais 1 e 2, posicionando os clones de *E. urophylla* (3,4 e 5) à esquerda do eixo da componente principal 1, os clones híbridos entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* (7,8 e 9) no quadrante inferior direito do gráfico (baixos valores de CP2 e altos valores de CP1) e os clones tolerantes 1 (*E. cloeziana*), 2 (híbrido entre *Corymbia citriodora* e *Corymbia toreliana*) e 10 (híbrido entre *E. urophylla* e *E. camaldulensis*).

Essa informação, obtida pela interpretação das Figuras 4 e 5, indica reações fisiológicas diferentes entre as espécies de eucalipto e semelhantes entre clones dentro de uma mesma espécie. Daí o cuidado que se deve ter ao extrapolar interpretações sobre uma espécie de eucalipto para outra, quando estamos trabalhando com as respostas fisiológicas frente a manipulações do ambiente.



**Figura 4** - Dispersão dos clones e das variáveis avaliadas em função dos escores e autovetores respectivamente das duas primeiras componentes principais.



**Figura 5** - Dispersão dos clones e das variáveis avaliadas em função dos escores respectivamente das três primeiras componentes principais.

## **Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico)**

A análise de variáveis canônicas foi utilizada também por ser um procedimento estatístico multivariado eficiente para avaliação do grau de similaridade entre os materiais genéticos em estudo (clones de eucalipto).

O objetivo principal dessa análise é proporcionar a simplificação estrutural dos dados, de forma que a divergência genética, influenciada, em princípio, por um conjunto com muitas variáveis, possa ser avaliada por um conjunto com poucas variáveis (variáveis canônicas), que são combinações lineares do conjunto maior, não correlacionadas e que possibilita uma avaliação gráfica bi ou tridimensional de fácil interpretação. Essas variáveis canônicas são também denominadas de super variáveis, por representar mais de uma variável original de grande importância na explicação da diversidade entre os clones.

Na Tabela 6 encontram-se as estatísticas utilizadas na avaliação das nove variáveis canônicas, quando comparou as 9 variáveis consideradas mais importantes desconsiderando as variáveis redundante, removendo assim incremento em altura e incremento em diâmetro, ficando somente com incremento em volume, que é uma combinação matemática das duas anteriores. Para esta análise a remoção de variáveis redundantes é importante para evitar o efeito de multicolinearidade.

**Tabela 6** - Estatísticas utilizadas na avaliação das nove primeiras variáveis canônicas.

<b>Variável canônica</b>	<b>R<sup>2</sup> canônico</b>	<b>Autovalor</b>	<b>F aproximado</b>	<b>NS</b>	<b>VARE</b>	<b>VAREA</b>
1	0,861	4762,84	9,31	0,001	67,02	67,02
2	0,814	1275,08	8,71	0,001	17,94	84,96
3	0,712	621,65	6,02	0,001	8,75	93,71
4	0,643	191,06	6,12	0,001	2,69	96,40
5	0,511	125,44	7,41	0,001	1,77	98,16
6	0,422	81,19	7,14	0,001	1,14	99,31
7	0,411	25,39	7,25	0,01	0,36	99,67
8	0,397	15,36	5,12	0,01	0,22	99,88
9	0,308	8,43	6,47	0,01	0,12	100

NS: Nível de Significancia; VARE: Variância explicada (%); VAREA: Variância explicada acumulada (%)

Observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas foram estatisticamente significativas, explicaram mais de 84% da variância total dos dados e apresentam

elevado R<sup>2</sup> canônico. Logo, as informações mais relevantes dos dados originais estão contidas nessas duas variáveis canônicas.

Na Tabela 7 encontram-se os autovetores nas duas primeiras variáveis canônicas, bem como a variância explicada por essas variáveis.

Pode-se observar na Tabela 7 que, as variáveis: INCVOL, ABA, ACSA, ZEATI, MEJA, ACC, AMINO, PROTE, SACA E PRORA, apresentaram autovetores pouco expressivos para as variáveis canônicas 1 e 2. Dessa forma, essas variáveis podem ser consideradas de baixa relevância no processo de agrupamento dos clones, tendo como base as duas primeiras variáveis canônicas analisadas.

Ainda analisando a Tabela 7, ACC e PROFO apresentaram nas duas primeiras variáveis canônicas valores significativos para os autovetores, sendo respectivamente - 10,98 e -4,06 para a VC1 e 4,18 e 6,61 para a VC2. Sendo que para a VC2 também aparece a variável GLICO com significativo valor de seu autovetor. Isso indica que estas três variáveis podem ser muito importantes no agrupamento e seleção de clones de eucalipto para tolerância a déficit hídrico.

**Tabela 7 - Autovetores das duas primeiras Variáveis canônicas.**

Variáveis Originais	Autovetores	
	Variável Canônica 1	Variável Canônica 2
INCVOL	0,0016	0,0026
ABA	-0,1549	1,0163
ACSA	0,0088	-0,1996
ZEATI	-0,0118	-0,2110
JASM	0,2207	0,8331
MEJA	0,7087	-0,6332
AIA	-10,9779	4,1762
ACC	-1,7414	0,0293
GLICO	1,1533	5,8570
FRUTO	-1,0520	-2,2462
AMINO	-1,1289	1,4463
PROTE	-1,1759	-1,0609
SACA	0,1112	0,0484
AMIDO	2,5303	-0,7381
PROFO	-4,0634	6,6127
PRORA	1,6079	-0,2986
<b>Autovalores</b>	<b>4762,84</b>	<b>1275,08</b>
<b>Variância explicada</b>	<b>67,02</b>	<b>17,94</b>
<b>Variância explicada acumulada</b>	<b>67,02</b>	<b>84,96</b>

À exceção da variável ACC, as variáveis mais importantes nesta análise (PROFO e GLICO), também foram identificadas como muito importantes na análise de componentes principais, confirmando a grande importância destas duas variáveis na seleção de material genético para tolerância a déficit hídrico.

Para auxiliar a formação e separação de grupos similares de clones, com base nos escores referentes às duas primeiras variáveis canônicas, também foi determinada a matriz de dissimilaridade entre os clones considerando a distância euclidiana quadrática, que pode ser vista na Tabela 8.

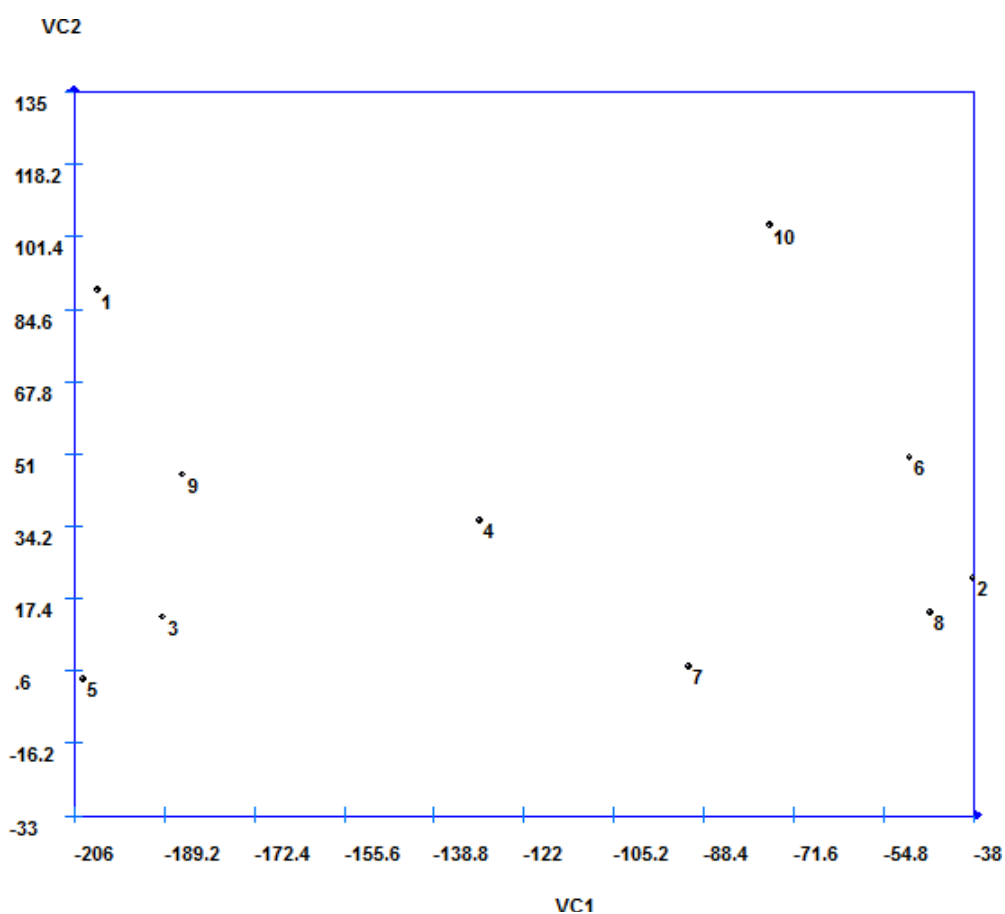
**Tabela 8** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	1,369								
3	0,5238	0,8349							
4	0,4404	0,3235	0,1722						
5	0,7326	1,0490	0,0266	0,3210					
6	0,9682	0,0761	0,8278	0,2527	1,1014				
7	1,1289	0,1396	0,3609	0,1596	0,4645	0,2743			
8	1,3799	0,0080	0,7432	0,2981	0,9281	0,1177	0,0877		
9	0,1739	0,8405	0,0991	0,1214	0,2149	0,6689	0,5027	0,7984	
10	0,5909	0,6584	1,2109	0,5289	1,5952	0,2869	0,9554	0,7625	0,7374

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

Assim como foi constatado para componentes principais (Figura 4 e 5), avaliando a Figura 6 podemos novamente observar uma nítida separação entre os clones sabidamente tolerantes a déficit hídrico (clone 1 e 10) na parte superior do gráfico. Sendo a VC2 e dentro dela as variáveis originais AIA, GLICO e PROFO (Tabela 7) as mais relevantes no agrupamento desses três clones considerados tolerantes.

A proximidade no gráfico da Figura 6 e o baixo valor de dissimilaridade na Tabela 8 (0,0080), entre os clones 2 e 8, indica similaridade de comportamento entre os mesmos. Porém não era de se esperar, uma vez que são clones de espécies diferentes e apresentam reações divergentes quando sob efeito de déficit hídrico, sendo um clone tolerante (2 = 2 TC) e o outro suscetível (8 = 8 GU).



**Figura 6** - Dispersão dos clones em função dos escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Como evidenciou a observação da Figura 6, a metodologia de análise por variáveis canônicas com exclusão de variáveis redundantes não se mostrou tão eficiente quanto à análise por componentes principais, pois a primeira conseguiu separar somente os clones 1 e 10, deixando ainda o clone 2, que é tolerante ao déficit hídrico pouco distanciado do grupo de clones susceptíveis na representação gráfica.

### **Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico)**

Na Tabela 9, estão apresentados, para a condição de crescimento sob déficit hídrico, os coeficientes de correlação entre as variáveis do grupo 1 (INCALT, INCDIAM, GLICO, FRUTO, AMINO, PROTE, SACA e AMIDO) originais e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis do grupo 1, bem como a correlação entre as variáveis originais do grupo 2 (ABA, ACSA, ZEATI, JASM, MEJA,

AIA, ACC, PROFO e PRORA) e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis do grupo 2.

Com base nos pares canônicos apresentados na Tabela 9, não se observou nenhuma variável significativa no primeiro par canônico (U1,V1) do grupo 1. Para as variáveis que compõem o grupo 2, as variáveis que apresentaram correlações significativas foram: ABA, ZEATI, PROFO e PRORA.

No segundo par canônico (U2,V2), houve predomínio das variáveis FRUTO e AMIDO no grupo 1, e somente ACSA no grupo 2.

No terceiro par canônico (U3,V3), para o grupo 1 obteve-se significância no resultado da correlação para as características, INCDIAM e FRUTO, e nenhuma variável para o grupo 2.

No quarto par canônico (U4,V4), houve alta correlação para a variável INCALT e SACA para o grupo 1 e somente AIA para o grupo 2.

No quinto par canônico (U5,V5), onde concentrou-se a maior quantidade de variáveis significativas, para o grupo 1 foram GLICO e PROTE, e para o grupo 2, ZEATI, JASM, MEJA e ACC.

No sexto par canônico (U6,V6), houve alta correlação apenas para a variável AMINO no grupo 1 e ABA no grupo 2.

No sétimo par canônico (U7,V7), houve alta correlação somente para a variável AMIDO no grupo 1 de variáveis, e nenhuma variável apresentou correlação significativa no grupo 2 para este par canônico.

**Tabela 9** - Correlação entre as variáveis originais de crescimento das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis originais (Ui).

Variável	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
<b>Grupo 1</b>							
INCALT	-0.0866	0.0286	-0.0330	<u>-0.6025</u>	-0.4697	<u>0.4518</u>	0.4058
INCDIAM	0.0343	0.4912	<u>0.6003</u>	0.4187	-0.4065	-0.0456	0.1904
GLICO	-0.0028	-0.4103	0.4176	0.1807	<u>-0.6400</u>	0.1443	-0.4336
FRUTO	-0.0259	<u>-0.5563</u>	<u>0.7426</u>	-0.0083	-0.0408	-0.0061	-0.3681
AMINO	-0.0884	-0.1581	-0.0013	0.4806	-0.2249	<u>0.6700</u>	-0.4141
PROTE	0.2120	0.3420	0.0547	0.3126	<u>0.5891</u>	0.2651	0.2323
SACA	0.0541	0.1343	0.1139	<u>0.6479</u>	-0.4785	0.1710	0.0986
AMIDO	0.1365	<u>0.7147</u>	0.3750	0.0541	-0.0067	0.2443	<u>-0.5115</u>
Variável	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
<b>Grupo 2</b>							
ABA	<u>-0.5532</u>	-0.2072	-0.1724	-0.1751	0.1734	<u>0.5657</u>	0.1678
ACSA	-0.2654	<u>-0.5444</u>	-0.2022	0.2368	0.2641	-0.0899	0.2143
ZEATI	<u>-0.5083</u>	-0.1043	-0.0820	-0.1795	<u>-0.6712</u>	0.0729	0.2422
JASM	0.0114	-0.1219	0.1378	-0.4658	<u>-0.8131</u>	-0.2539	0.1066
MEJA	-0.0362	0.0696	0.1768	0.1055	<u>-0.9480</u>	0.2135	-0.0638
AIA	-0.2851	-0.2011	-0.2032	<u>-0.6669</u>	0.4128	0.3676	0.0461
ACC	0.4618	-0.1896	0.0055	-0.0259	<u>0.6995</u>	0.3323	-0.0248
PROFO	<u>-0.5179</u>	-0.1583	0.2706	0.3100	-0.0285	0.4836	0.1817
PRORA	<u>-0.5936</u>	<u>-0.3149</u>	-0.1892	-0.0782	-0.2776	0.0756	-0.1218

Valores sublinhados referem-se a correlações significativas a 5% e representam as variáveis que predominaram na explicação da variância total

## CONCLUSÕES

As plantas podem aumentar a produção de açúcares e de prolina para fazer o ajuste osmótico e esse ajuste está diretamente relacionado à capacidade das plantas manterem a produção mesmo em déficit hídrico.

Os clones 1 CL e 10 UC, considerados tolerantes em campo, apresentaram significativo aumento da concentração de ABA sob déficit hídrico, o que é uma vantagem competitiva em ambientes com escassez de água, indicando que esses clones têm potencial em obter maior controle estomático em situação de déficit hídrico.

O clone 10 UC, considerado mais tolerante ao déficit hídrico em condição de campo, foi o mais responsivo ao déficit hídrico, produzindo três vezes mais jasmonato que em condição de irrigação ideal. O que é muito importante uma vez que o aumento da concentração do ácido jasmonato está altamente relacionado com a defesa contra o estresse abiótico. Outro mecanismo de busca de tolerância a estresse hídrico pelo clone 10 UC foi aumentar significativamente a produção de glicose e frutose, quando sob condição de déficit hídrico.

O aumento significativo da concentração de açúcares e prolina no clone 10 UC pode ser a maior garantia de manutenção da produtividade deste material genético sob condição de estresse hídrico. Pois essas duas variáveis são excelentes osmorreguladores e protetores.

Para o agrupamento de clones tolerantes ao déficit hídrico, levando-se em consideração as variáveis deste estudo, o método que mais se aproximou, em apresentar um resultado similar ao que se observa em campo em plantios comerciais, foi o agrupamento via análise de componentes principais. Sendo que, por esta análise, interpretamos que as variáveis mais aplicáveis a separação de clones para tolerância foram ABA, MEJA e GLICO.

A análise de componentes principais e variáveis canônicas, sugerem, pela diferença de posicionamento dos clones 10 UC e 1 CL (tolerantes ao déficit hídrico) na representação gráfica, que os mesmos estão sob influência de diferentes variáveis, indicando mecanismos diferentes de tolerância para estes dois materiais genéticos pertencentes a espécies distintas do gênero *Eucalyptus* e *Corimbia*.

## Referências

Blum A (2016) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell and Environment* 40:4-10

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Cassel DK, Nielsen DR (1986) Field capacity and available water capacity. In: KLUTTE A. *Methods of soil analysis*. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2.ed. Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of Agronomy, 901-926.

Chung PJ, Jung H, Choi Y, Kim JK (2018) Genome-wide analyses of direct target genes of four rice NAC-domain transcription factors involved in drought tolerance. *BMC Genomics* 19:1-17

Cordeiro YEM, Tavares FB, Nascimento AWS, Wagner H, Pena A (2017) Aspectos bioquímicos de plantas jovens de açaízeiro (*Euterpe oleraceae*) sob dois regimes hídricos na Amazônia Oriental. *Biota Amazônia* 7:52-56

Correia B, Pintó-Marijuan M, Castro BB, Brossa R, López-Carbonell M, Pinto G (2014) Hormonal dynamics during recovery from drought in two *Eucalyptus globulus* genotypes: from root to leaf. *Plant Physiol Biochem* 82:151-60

Cruz CD (2013) GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:271-276

Deuner C, Borges CT, Almeida AS, Meneghello GE, Tunes LVM (2015) Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. *Revista de Ciências Agrárias* 38: 275-281

Echevarria-Zomeno S, Ariza D, Jorge I, Lenz C, del Campo A, Jorin JV, Navarro RM (2009) Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *Journal of Plant Physiology* 166:233-245

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J et al. (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16: 3304-3325

Gimeno TE, McVicar TR, O'Grady AP, Tissue DT, Ellsworth DS (2018) Elevated CO<sub>2</sub> did not affect the hydrological balance of a mature native *Eucalyptus* woodland. *Global Change Biology* 0:1-15

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório 2017. São Paulo, 2017. 2-77p.

McKiernan AB, Potts BM, Brodribb TJ, Hovenden MJ, Davies NW, McAdam SAM, Ross JJ, Rodemann Thomas, O'Reilly-Wapstra JM (2016) Responses to mild water deficit and rewatering differ among secondary metabolites but are similar among provenances within *Eucalyptus* species. *Tree Physiology* 0:1-15

Merchant A, Tausz M, Arndt SK, Adams MA (2006) Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit 29: 2017-2029

Merchant, A., Callister, A., Arndt, S., Tausz, M. and Adams, M., (2007). Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. *Annals of Botany*, 100(7), pp.1507-1515.

Mizutani M, Kanaoka MM (2017) Environmental sensing and morphological plasticity in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10:1084-9521

Müller M, Munné-Bosch S (2011) Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Plant Methods* 7:37.

Nolan RH, Tarin T, Santini NS, McAdam SAM, Ruman R, Eamus D (2017) Differences in osmotic adjustment, foliar abscisic acid dynamics, and stomatal regulation between an isohydric and anisohydric woody angiosperm during drought. *Plant Cell Environ* 12:3122-3134

Shabnam N, Tripathi I, Sharmila P, Pardha-Saradhi P (2016) A rapid, ideal, and eco friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma* 253: 1577-1582

Sussmilch FC, McAdam SAM (2017) Surviving a Dry Future: Abscisic Acid (ABA)-Mediated Plant Mechanisms for Conserving Water under Low Humidity 6:0-24

## CAPÍTULO 4

### **Análises morfoanatômicas em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico**

#### **Introdução**

A demanda por produtos florestais tem aumentado nas últimas décadas, ao passo que as previsões climáticas têm relatado maior mortalidade arbórea em resposta a episódios de seca severa no mundo (Breshears et al. 2005; Allen et al. 2010; Brien et al. 2015). Sabe-se que a água é o maior limitante ao crescimento e produtividade das plantas, por esse motivo, estudos para maior compreensão sobre como a planta se prepara fisiologicamente para os períodos de seca (Allen et al. 2015), passam a ter cada vez mais importância para que esses conhecimentos sejam aplicados em programas de melhoramento de plantas.

Atualmente, existe um consenso que extremos de precipitação se tornaram cada vez mais frequentes, assim como estações de seca prolongadas com substancial importância e impacto na produtividade florestal (Reichstein et al. 2013; Boisier et al. 2015). A persistência da produção florestal atual depende da capacidade de aclimação ou resiliência face às mudanças climáticas das espécies plantadas.

De acordo com Bourne et al. (2015) espécies originadas de climas mais úmidos têm maior uso de água e também uma maior sensibilidade estomática para déficit de pressão de vapor. A seleção de indivíduos dessa região, historicamente, resulta em árvores adaptadas para climas favoráveis com fechamento estomático para manter a integridade hidráulica da planta quando as condições ficam desfavoráveis. Mas essas características são constrictantes para plantá-las nas regiões subúmidas, pois para essa região, as árvores nativas foram selecionadas pelo seu ambiente para manter a condutância, apesar dos altos déficits hídricos alcançados e, também, possuem um sistema hidráulico reforçado (indicado por vasos mais estreitos) em vez de alta sensibilidade estomática para déficit de pressão de vapor, para evitar a ocorrência de cavitação.

As características estomáticas e hidráulicas são importantes para entender como as plantas vão tolerar e responder a climas atuais e futuros, qual impacto as mudanças climáticas terão na sobrevivência, produtividade e eficiência no uso da água.

As espécies diferem em sua capacidade de lidar com o estresse hídrico (Bartlett et al. 2012; Choat et al. 2012; Rowland et al. 2015), podendo morrer por inanição de carbono ou falha hidráulica, ou ambos ao mesmo tempo (McDowell 2011; Anderegg et al. 2012; Galiano et al. 2012; Anderegg et al. 2013; Hartmann et al. 2013; Brodrigg e McAdam 2015). Para o clima tropical, foram encontradas evidências sobre inanição de carbono e evidências mais recentes apontando para a falha hidráulica como principal gatilho para a mortalidade induzida pela seca (Rowland et al. 2015).

Algumas características anatômicas possuem grande influência na manutenção da hidratação da planta, como por exemplo: a espessura foliar, a densidade estomática, o diâmetro do xilema e sistema de venação foliar. Essas variáveis foram avaliadas no presente trabalho, buscando maior compreensão da relação entre elas e a tolerância ao déficit hídrico.

## Materiais e métodos

### Material vegetal

Dez clones comerciais, sendo cinco selecionados na região Nordeste de Minas Gerais (1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR) e cinco selecionados na região Norte da Bahia (6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC) (Tabela 1), os quais foram obtidos a partir do cruzamento das espécies representadas na Tabela 2. As mudas desses clones foram selecionadas visualmente quanto à uniformidade de desenvolvimento e sanidade, após foram cultivadas em vasos plásticos, cobertos por saco plástico para impermeabilizar o vaso, com volume de cinco litros contendo solo peneirado de textura média (Tabela 2) e adubado com 10 g de Osmocote® de formulação NPK 19-6-10, com 3 repetições, e mantidos em viveiro de mudas coberto do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil no período entre 01/12/2015 a 08/04/2016.

**Tabela 1** - Identificação de clones comerciais.

Código	Cruzamento	Tolerância observada em campo	Grau de tolerância (observações de campo)	1º LOCAL DE SELEÇÃO
1CL	<i>E.cloeziana</i>	Tolerância	6	Itamarandiba - MG
2TC	1/2 <i>C. torelliana</i> ; 1/2 <i>C. citriodora</i>	Tolerância	8	Periquito -MG
3UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	4	Itamarandiba - MG
4UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
5UR	<i>E.urophylla</i>	Suscetível	3	Itamarandiba - MG
6GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	2	Entre Rios - BA
7GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
8GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Inhambupe - BA
9GU	1/2 <i>E. grandis</i> ; 1/2 <i>E. urophylla</i>	Suscetível	4	Entre Rios - BA
10UC	1/2 <i>E.camaldulensis</i> ; 1/2 <i>E.grandis</i>	Tolerante	10	Biringinga - BA

**Tabela 2** - Caracterização climática do ambiente natural de origem das espécies utilizadas no cruzamento para formação dos clones testados.

Espécies	Clima	Precipitação (mm)	Altitude (m)	Temperatura média max. (°C)
<i>C. torelliana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E. cloeziana</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	40-100	29-34
<i>E. urophylla</i>	Temperada, tropical e subtropical	1500-2800	200-1200	27-36
<i>C. citriodora</i>	Temperada, tropical e subtropical	800-1200	0-1200	27-39
<i>E. grandis</i>	Tropical e subtropical	1200-3200	0-800	36
<i>E. camaldulensis</i>	Deserto, temperado, equatorial, tropical e subtropical	150-1100	20-700	26-39

**Tabela 3** - Características físicas e químicas do Latossolo Vermelho + 30% de areia.

Análise granulométrica (kg.kg <sup>-1</sup> )												
Areia	Silte		Argila		Classe textura		Equivalente em umidade (Kg Kg <sup>-1</sup> )					
0,632	0,123		0,181		Franco arenoso		0,18					
Análise química (cmol/dm <sup>3</sup> )												
pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	m	V	
H <sub>2</sub> O	...(mg/dm <sup>3</sup> )...		.....(cmol/dm <sup>3</sup> ).....									.....%.....
5,46	5,7	8	0,71	0,09	0,0	0,8	0,82	0,82	1,62	2	50,6	

\* Análise realizada no laboratório de análise de solos, tecido vegetal e fertilizante da Universidade Federal de Viçosa.

A capacidade de campo do solo foi calculada através do método do equivalente de umidade (EU), em que amostras peneiradas de solos, ou seja, amostras deformadas de solo, previamente saturadas com água, foram centrifugadas a 1000 xg, durante 30 minutos, ao potencial de -33 kPa (Cassel e Nielsen, 1986), depois as amostras foram pesadas e levadas a estufa até atingirem massa seca constante. Foi considerada a capacidade de campo a quantidade de água que permaneceu no solo após a centrifugação, que calculado pela diferença entre o peso úmido do solo e o peso seco, passou a ser considerada a quantidade de água necessária para atingir 100% da capacidade de campo do solo.

As mudas foram irrigadas por três meses para adaptação ao substrato e ao ambiente e para simulação das condições de chuva em campo, com lâmina de água ideal

para atingir 90% da capacidade de campo do solo (CC) e, após esse período, foram aplicados os tratamentos durante 40 dias, sendo 50% da capacidade de campo do solo (CC), simulando déficit hídrico, e 90% da CC, simulando irrigação ideal.

### **Análises de crescimento e trocas gasosas**

As variáveis de crescimento foram mensuradas no início do plantio e no final do experimento, com análises morfológicas de altura (cm) e diâmetro de coleto (mm).

As avaliações das trocas gasosas, realizadas entre 08:00 h e 11:00 h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ( $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), concentração atmosf\u00e9rica de  $\text{CO}_2$ , temperatura e umidade ambientes, no segundo par de folhas completamente expandida (V4), por meio do analisador de gases do infravermelho (IRGA), equipado com um fluor\u00f4metro (modelo LI-6400xt, LI-COR Inc., Lincoln, USA), resultaram nos seguintes par\u00e2metros: taxa de assimila\u00e7\u00e3o l\u00edquida do  $\text{CO}_2$  (A) e condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (gs). As vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia da clorofila foram obtidas na mesma folha utilizada na medi\u00e7\u00e3o das trocas gasosas, utilizando o fluor\u00f4metro acoplado ao IRGA. Com as vari\u00e1veis registradas nas plantas adaptadas ao claro e ao escuro, foram obtidos e/ou calculados o seguinte par\u00e2metro: o rendimento qu\u00e2ntico potencial do PSII (Fv/Fm) (Genty et al. 1989; Bilger et al. 1995).

### **An\u00e1lises anat\u00f4micas**

Para o estudo anat\u00f4mico, foram coletadas folhas completamente expandidas, do terceiro ou quarto par de folhas, no ter\u00e7o m\u00e9dio das plantas, e caules na regi\u00e3o do coleto. Posteriormente, as amostras foram fixadas em FAA50, por 48 h, e estocadas em etanol 70 % (Johansen, 1940). Em seguida, o material vegetal foi inclu\u00eddo em metacrilato (Historesin-Leica), segundo as recomenda\u00e7\u00f5es do fabricante.

As folhas foram seccionadas transversalmente, em micr\u00f3tomo rotativo de avan\u00e7o autom\u00e1tico (modelo RM2155, Leica microsystems Inc., Deerfield, USA), com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al. 1964), e os caules seccionados em lâmina de a\u00e7o para cortes de esp\u00e9cies lenhosas. Fragmentos da parte central da lâmina foliar foram seccionados a partir de material armazenado em \u00e1lcool 70%, posteriormente, iniciou-se o processo de diafaniza\u00e7\u00e3o das folhas segundo metodologia descrita por Strittmatter (1973) e modificada para a esp\u00e9cie.

As amostras foram imersas em etanol 95% e mantidas em placas de Petri sobre a chapa aquecedora a 100 °C por 5 min, posteriormente, sendo imersas em solução de etanol 95% + NaOH 5% (1:1) sob as mesmas condições. Ao serem retiradas da chapa aquecedora, as amostras foram lavadas em água destilada e submersas em hipoclorito a 20% até ficarem totalmente translúcidas. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada, para a remoção completa do alvejante, imersas em álcool 70% por 10 min e coradas em safranina. Após o processo de coloração, as amostras passaram por imersão em etanol 80, 70 e 50% e, posteriormente, foram lavadas em água destilada. As lâminas histológicas com os fragmentos foliares foram montadas em gelatina glicerinada. As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japan) acoplado a câmera fotográfica digital (modelo Zeiss AxioCam HRc, Göttinger, Germany) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision.

As imagens obtidas foram digitalizadas e armazenadas. Para as análises estruturais, 10 campos distintos de cada amostra foram medidos por meio do software Image-Pro® Plus (version 4.1, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA). Nas secções foliares foram avaliadas a espessura da lâmina foliar total, espessura do mesófilo (EM), da epiderme nas faces inferior (EI) e superior (ES), 5 face superior da epiderme/limbo e face inferior da epiderme/limbo. Nas secções de caule, foram avaliados número de elementos de vaso e diâmetro de elemento de vaso. Nos fragmentos de folhas diafanizadas foram avaliadas a densidade estomática e densidade de venação (DV). Todas as folhas das plantas de testadas foram coletadas e separadas dos caules com ajuda de uma tesoura, acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados e encaminhadas ao laboratório. Avaliando-se a área foliar (AF), utilizando-se de um digitalizador de imagens (scanner), acoplado a um microcomputador, onde foram digitalizadas as folhas, e as imagens digitais foram manuseadas conforme realizado por Jadoski et al. (2012) utilizado o Software ImageJ® (Powerful Image Analysis). Com base na imagem de uma folha completa, o software por meio de procedimentos de contraste de cores e de comparação com uma escala real presente (5 x 5 cm), foi calculado a área total real da folha (cm<sup>2</sup>).

## **Análise nutricional**

Após escaneadas, as amostras de folhas foram secas em estufa a 80 °C até a obtenção da massa seca constante. Para determinação da concentração de potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca), 100 mg do material vegetal foi mineralizado com mistura nitro-perclórica (2:1), em um bloco digestor, com temperatura controlada em torno de 100 a 120 °C até a completa oxidação do material vegetal (Marin et al. 1993). O K foi medido por fotometria de chama e o Mg e o Ca, por espectrofotometria de absorção atômica, conforme metodologia proposta por Malavolta (1997).

## **Análise estatística**

Os experimentos foram realizados de acordo com um esquema fatorial 2x10 (2 capacidades de campo e 10 clones diferentes), com 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso com uma planta. Foram avaliados dois percentuais da capacidade de campo do solo (CC), aplicados de acordo com a diferença de peso do sistema (vaso, solo, tutor e água) para atingir (50% e 90% CC) simulando, respectivamente déficit hídrico e irrigação ideal.

Em relação às variáveis, foi feito teste de Normalidade Shapiro-Wilk, todas variáveis foram submetidas à ANOVA e estimativa dos parâmetros genéticos, obtidas utilizando software GENES/UFV no modelo fatorial simples:

$$\text{Modelo: } Y_{ijk} = m + G_i + B/A_{jk} + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{ijk}$ : valor fenotípico do caráter Y medido no material genético i, no ambiente j

m: média geral paramétrica dos dados em estudo

$G_i$ : efeito do i-ésimo genótipo

$B/A_{jk}$ : efeito de blocos dentro de ambiente

$A_j$ : efeito do j-ésimo ambiente experimental

$GA_{ij}$ : efeito da interação do i-ésimo genótipo com o j-ésimo ambiente

$E_{ijk}$ : erro médio associado à observação  $Y_{ijk}$

Considerando o efeito de genótipo como fixo e o efeito de ambiente aleatório.

Para a comparação entre as médias de cada clone, para cada variável, foi realizado o teste de média, Tukey (5% de probabilidade). O resultado foi apresentado

em gráfico para cada variável, priorizando a disposição das barras conforme o ranqueamento dos clones para déficit hídrico, facilitando a visualização do comportamento susceptível e tolerante.

Para avaliação da importância dos caracteres, na avaliação dos clones tolerantes ao déficit hídrico, foi realizada uma análise multivariada de componentes principais, variáveis canônicas, dissimilaridade e correlações canônicas (Software GENES, Cruz 2013).

Algumas variáveis apresentadas no Capítulo 1, foram analisadas novamente no Capítulo 2, pois precisamos garantir que os clones selecionados como tolerantes sejam avaliados também quanto à produtividade dos mesmos.

## Resultados e discussões

Para a variável espessura total (Figura 1A) nenhum dos clones apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O Clone 10 CU foi o clone que apresentou maior espessura total e o clone 2 TC foi o que apresentou menor. Para a variável espessura da epiderme superior (Figura 2B), os clones 4 UR, 7 GU e 5 UR apresentaram diferença estatística e menor espessura epidérmica superior quando estressadas. Já o clone 1 CL apresentou diferença estatística entre os tratamentos, mas a espessura foi menor quando sob déficit hídrico. Os demais clones não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

A variável espessura epidérmica inferior só apresentou diferença estatística entre os tratamentos para os clones 4 UR e 5 UR (Figura 1C). Para a variável espessura do mesófilo, apenas o clone 9 GU apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 1D). Na Figura 3, pode-se observar que existem diferenças entre a espessura foliar total, epidérmica abaxial, adaxial e também na área foliar entre os clones. Diferença justificada pela origem dos cruzamentos, que possuem diferentes espécies.

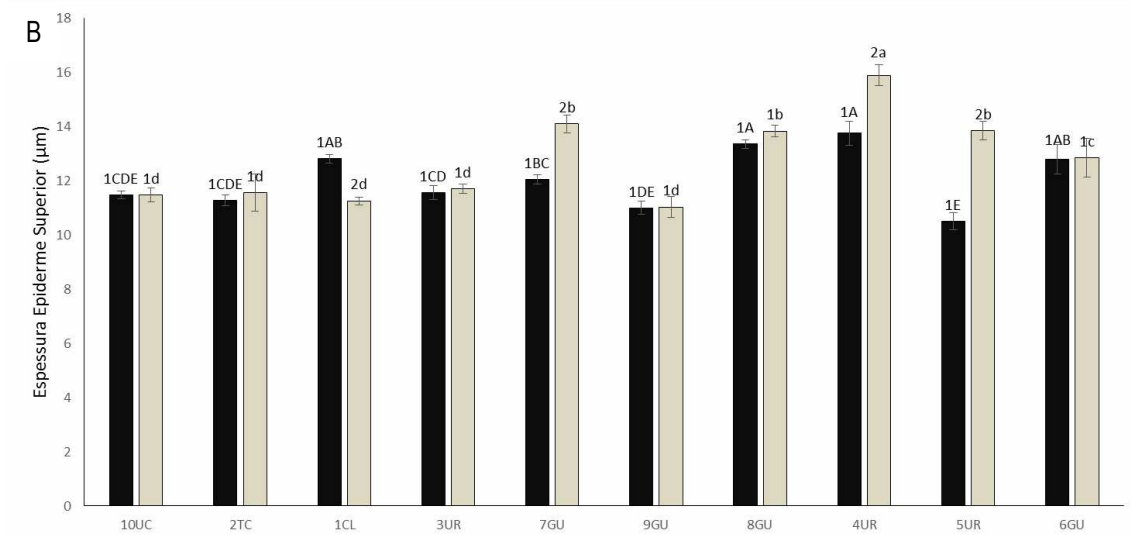
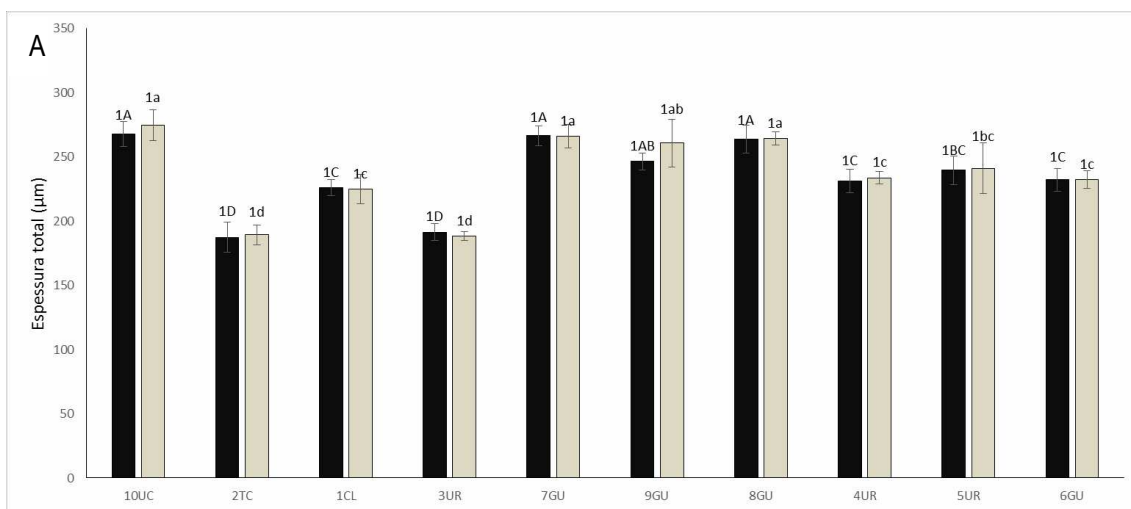
Com relação à densidade estomática da epiderme superior, os clones 8 GU, 3 UR, 9 GU, 7 GU e 5 UR quando sob déficit hídrico apresentaram diferença estatística e menor densidade. Os clones 5 UR e 3 UR apresentaram diferença estatística e maior diferença entre os tratamentos (Figura 1E).

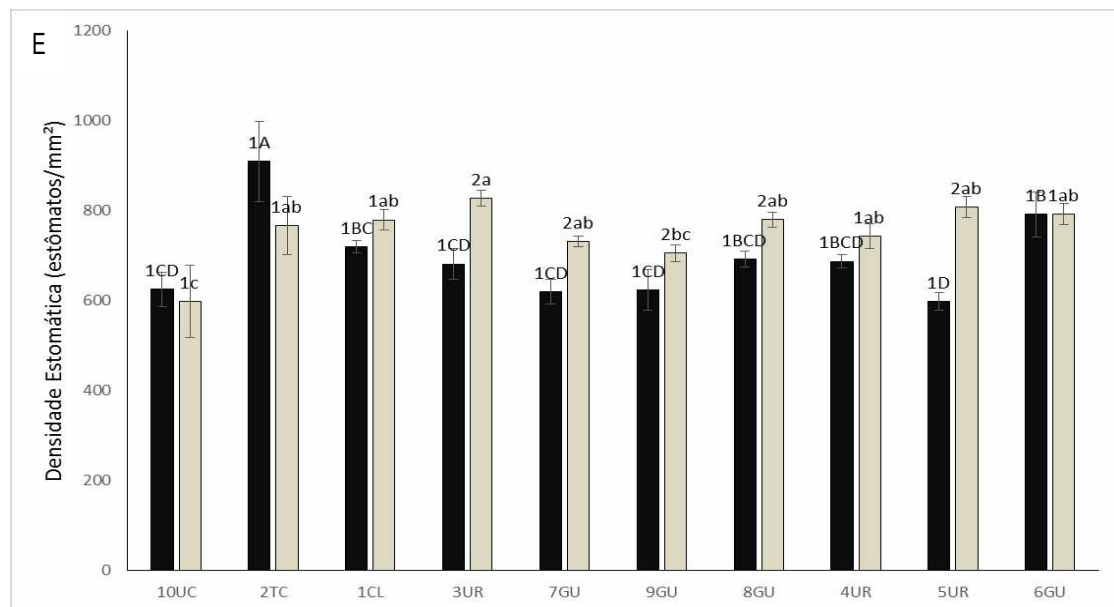
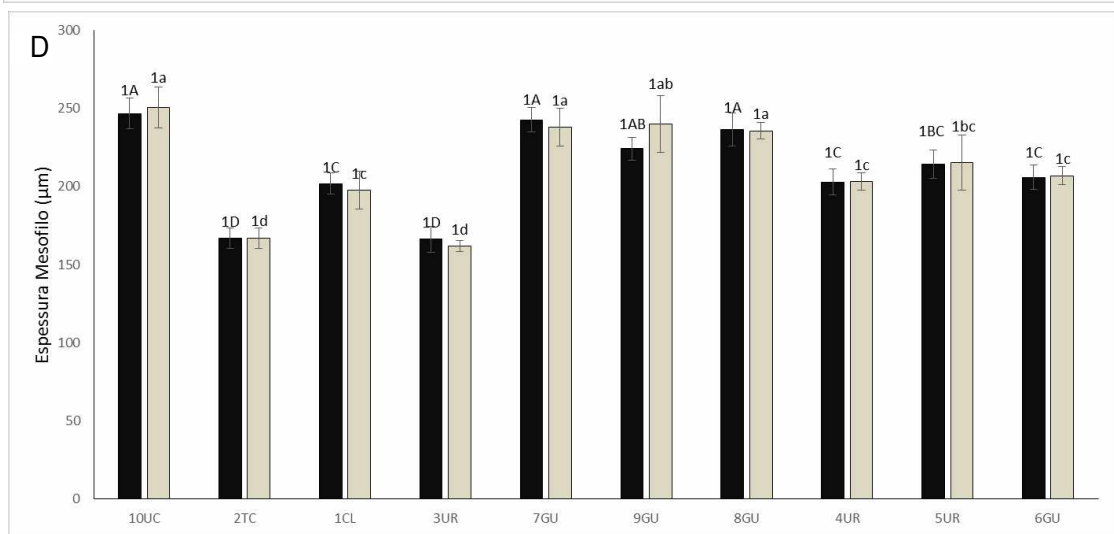
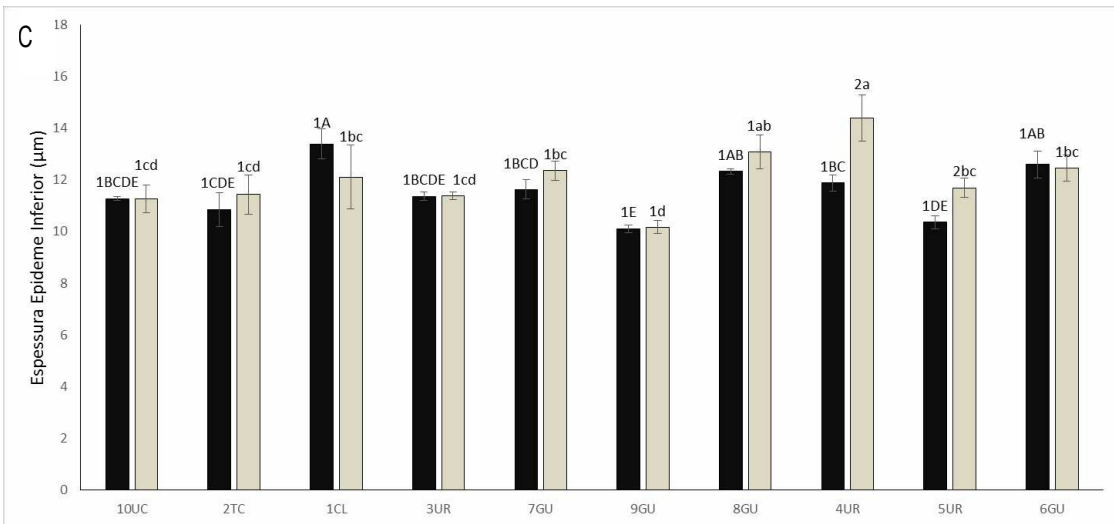
Para área foliar, todos os clones apresentaram diferença estatística e redução na área foliar quando submetido ao déficit hídrico, sendo que os clones considerados tolerantes foram os que apresentaram menor área foliar. E o clone 10 UC e o 2 TC, menor redução da área foliar quando sob déficit hídrico (Figura 1F).

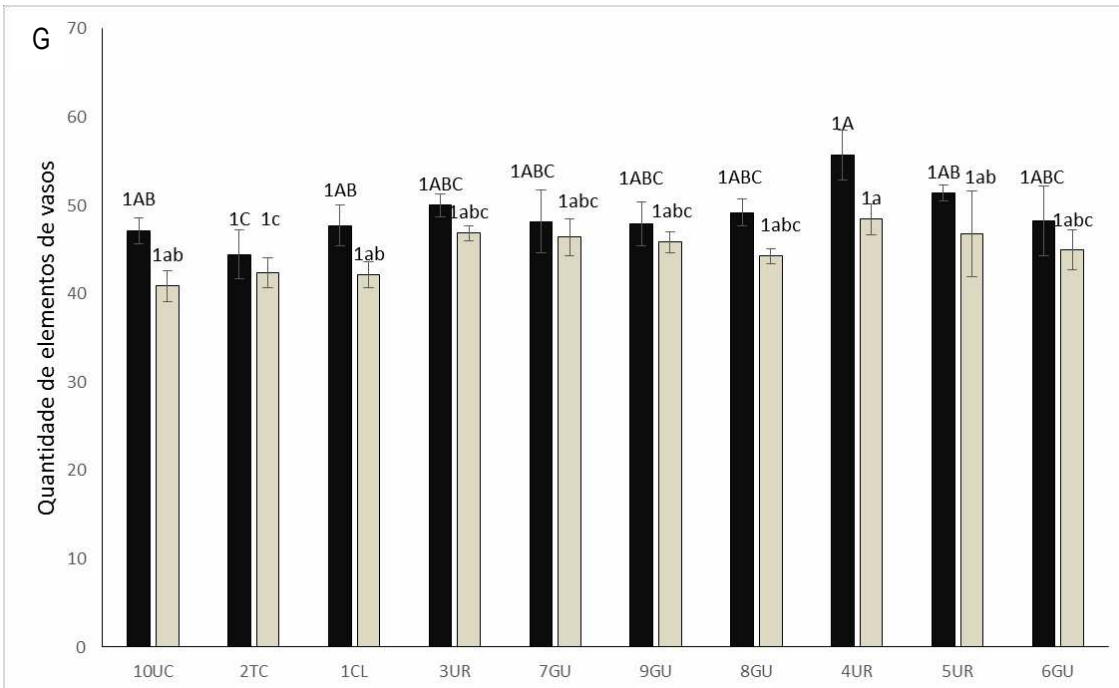
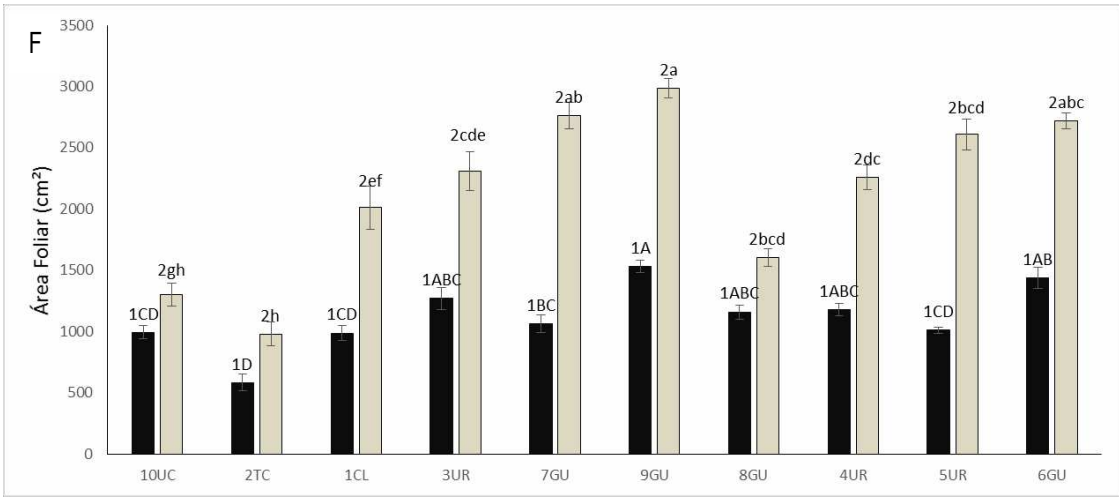
Com relação ao número de vasos do caule não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos, ocorreu apenas entre os clones; sendo que os clones considerados tolerantes possuem menor quantidade de vasos que os demais (Figura 1G). Na Figura 5, ficou evidenciado que existe diferença entre os clones.

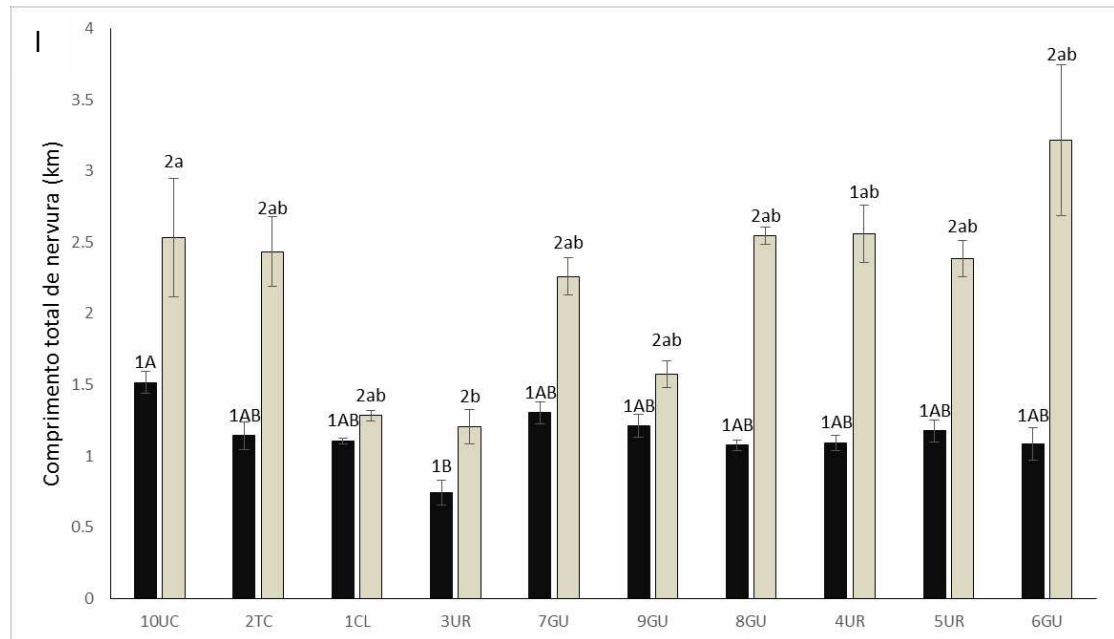
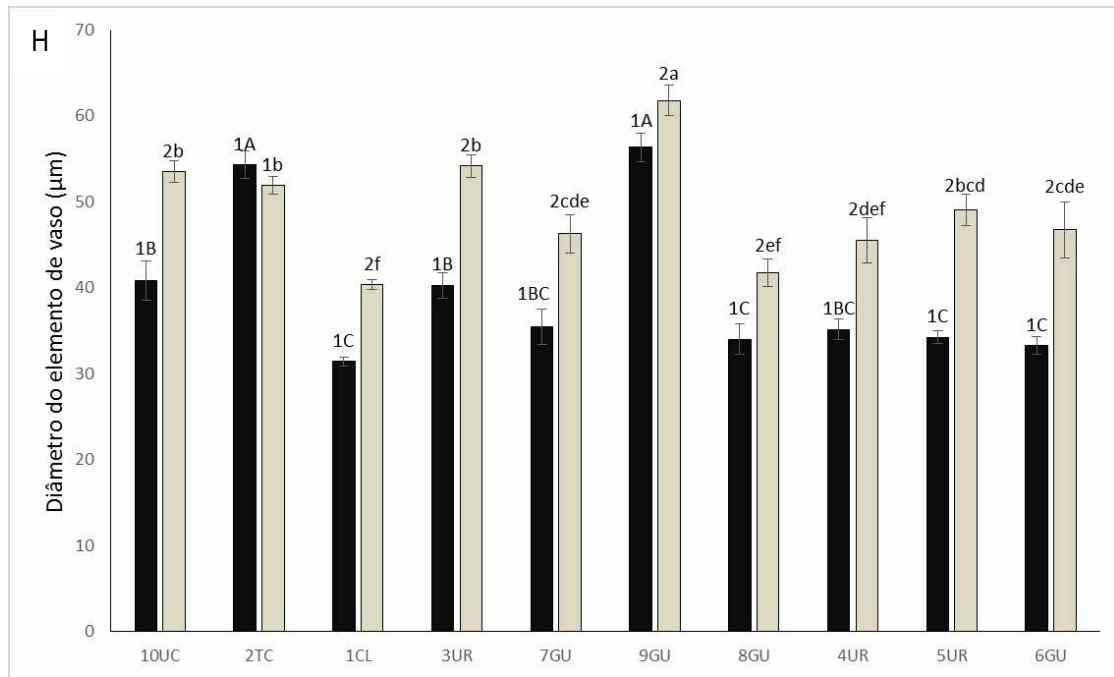
Apenas o clone 9 GU não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, todos os demais apresentaram diferença e possuíam maior diâmetro quando irrigados adequadamente (Figura 1H). Pode-se observar, na Figura 4, que os vasos das plantas irrigadas adequadamente apresentaram diâmetros maiores.

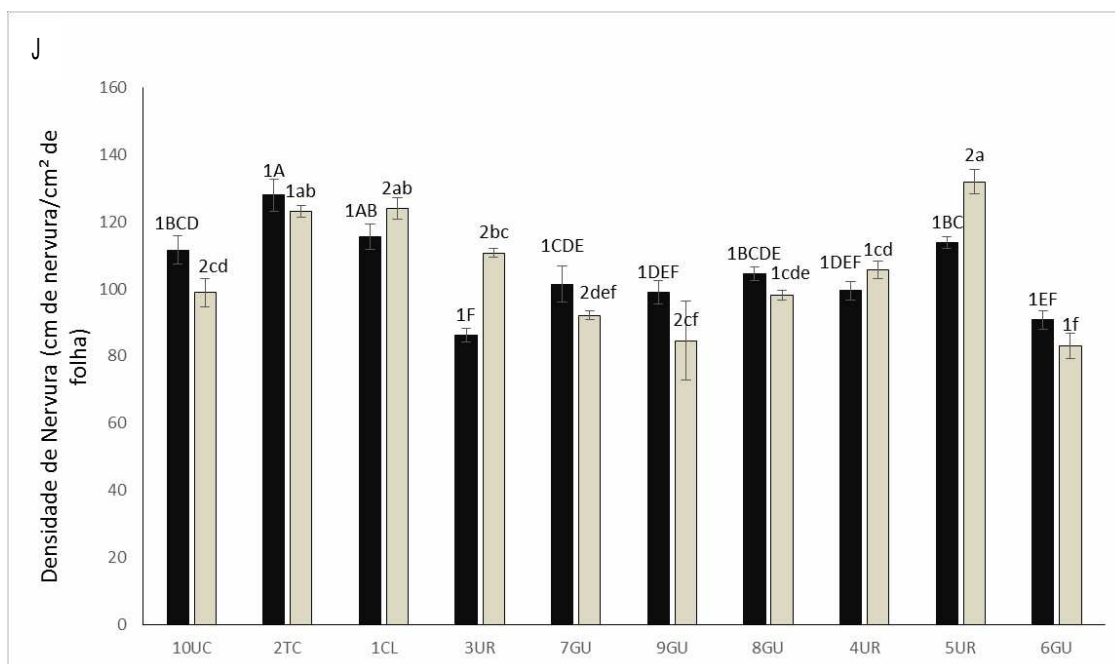
O comprimento total de nervura foi maior para todos os clones quando submetidos ao déficit hídrico. A diferença entre o comprimento da nervura para as plantas com déficit hídrico e irrigação ideal foram menores para os clones 10 UC, 2 TC e 8 GU (Figura 1I). Sendo que essa variável sofre muito interferência do resultado apresentado para a variável área foliar, para reduzir essa influência também foi calculada a densidade de nervuras. A diferença entre a densidade de nervuras das plantas irrigadas adequadamente e com déficit hídrico foi menor que a diferença apresentada para o comprimento de nervura (Figura 1J).











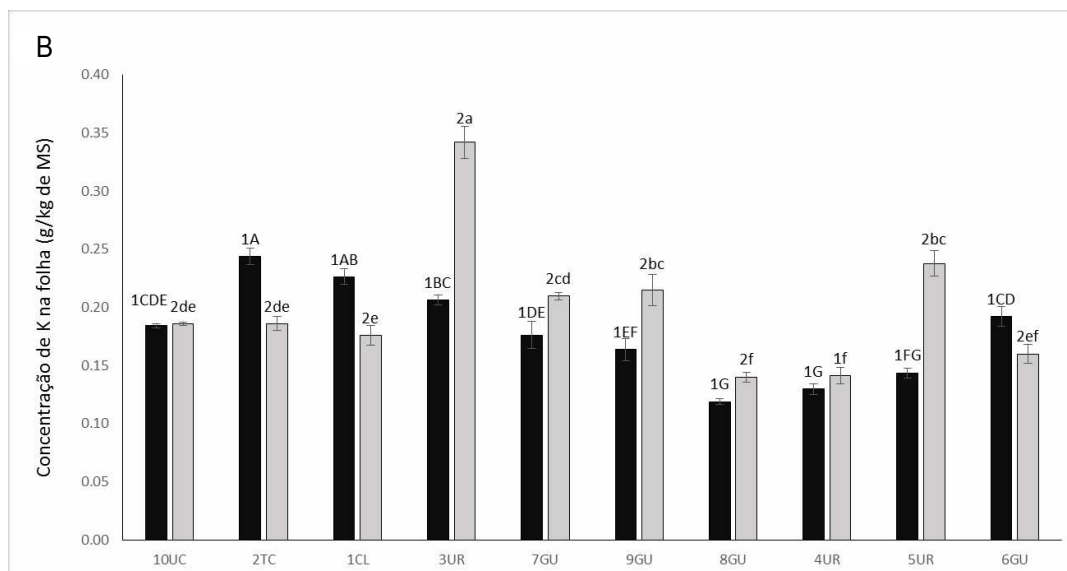
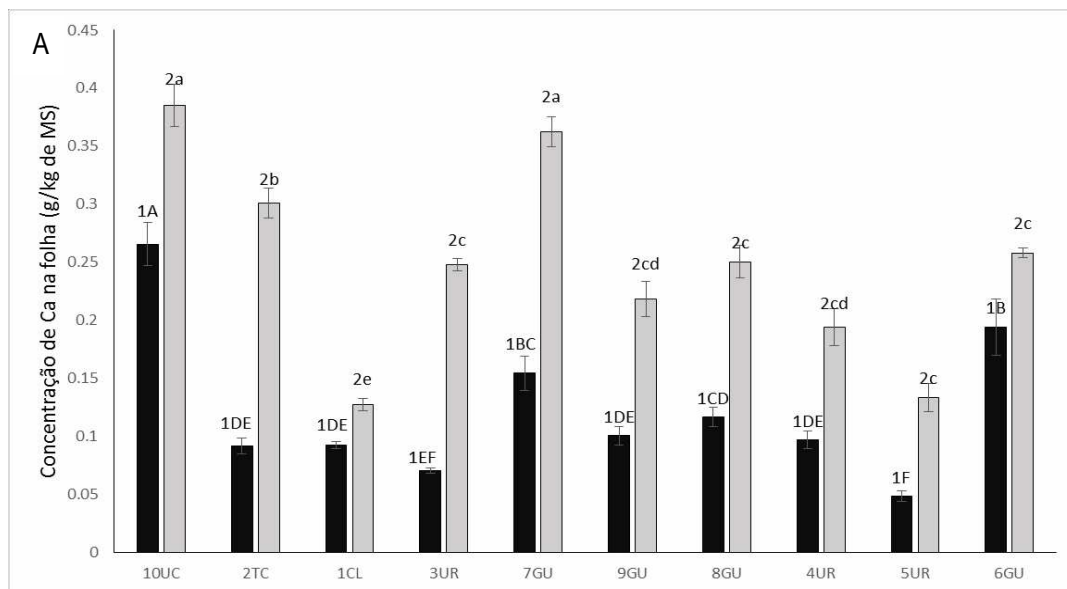
**Figura 1** - Espessura total da folha (A), espessura da epiderme superior (B) espessura da epiderme inferior (C) espessura do mesofilo (D) densidade estomática (E) área foliar (F) quantidade de elementos de vasos do caule (G) diâmetro de elementos de vasos do caule (H) comprimento total de nervura (I) e densidade de nervura (J) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) e controle (CC 90%). Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.

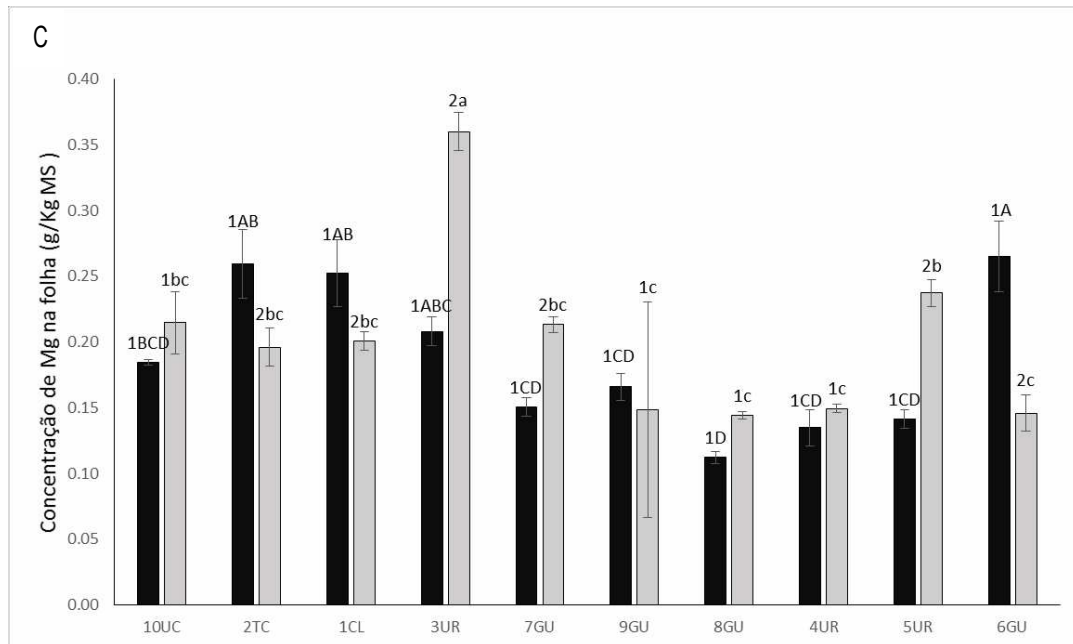
Ocorreu diferença estatística entre os tratamentos e menor absorção de Ca quando sob déficit hídrico (Figura 2A). Apenas o clone 10 UC não apresentou diferença estatística entre os tratamentos para a variável K (Figura 2B) e os clones 10 CU, 9 GU, 4 UR e 8 GU não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos para Mg (Figura 2C).

Foram encontradas concentrações nas folhas maiores dos clones testados quando a planta foi submetida ao déficit hídrico para os macronutrientes K e Mg, no entanto, os níveis estavam adequados quando comparados com os dados apresentados por WADT et al. (1998).

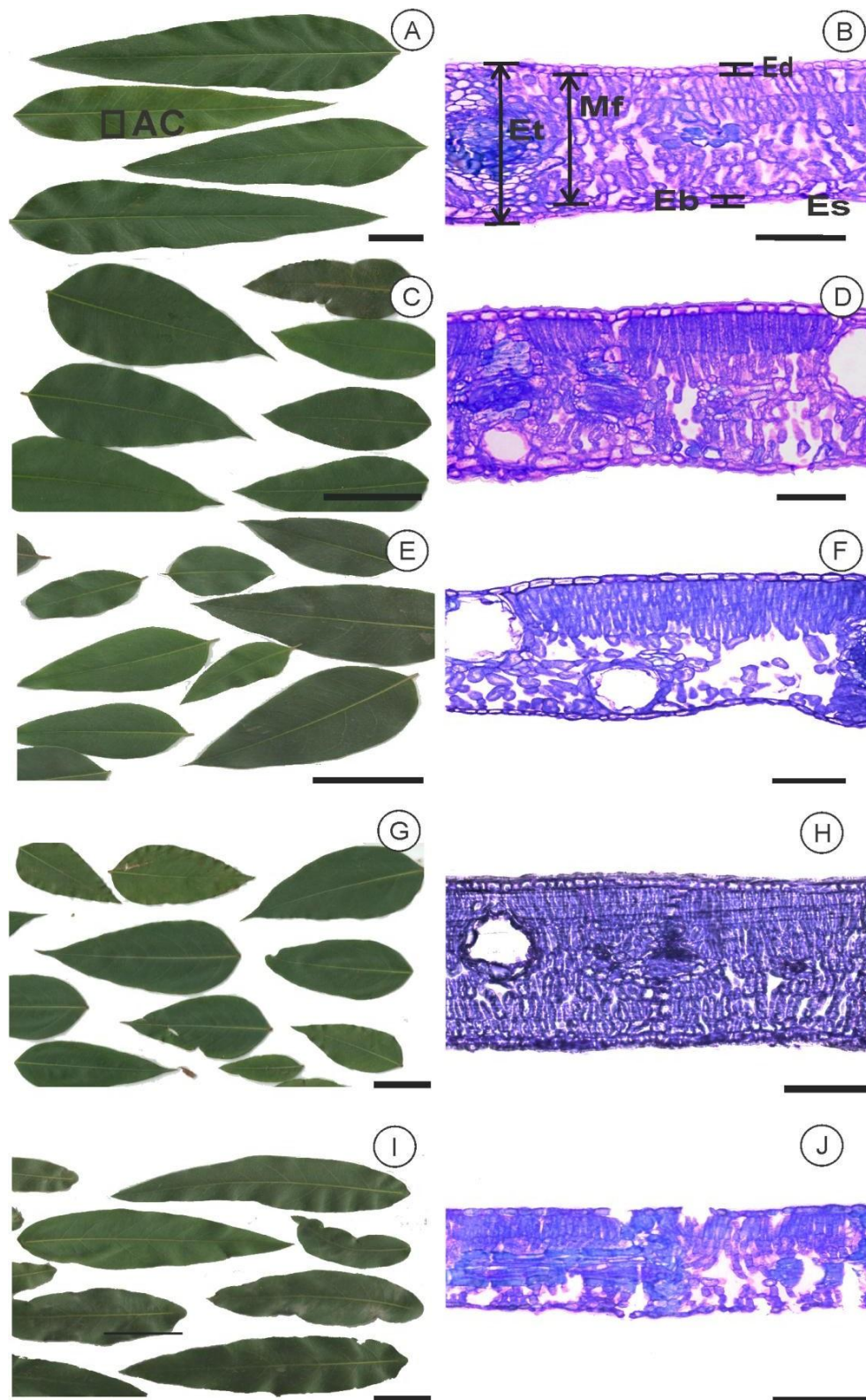
Espera-se que com a redução da água disponível no solo, provoque redução do fluxo de massa e, por consequência, ocorra redução dos nutrientes na planta, porém para o potássio o efeito encontrado por Christina et al. (2015) foi contrário ao esperado e corrobora com o resultado apresentado na (Figura 2B), em que os clones testados

apresentaram maior concentração de potássio e magnésio sob déficit hídrico. Assim como observado também por Battie-Laclau et al. (2014) em estudo feito com *Eucalyptus grandis* testando o efeito de déficit hídrico, as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram maior concentração de K que as demais.

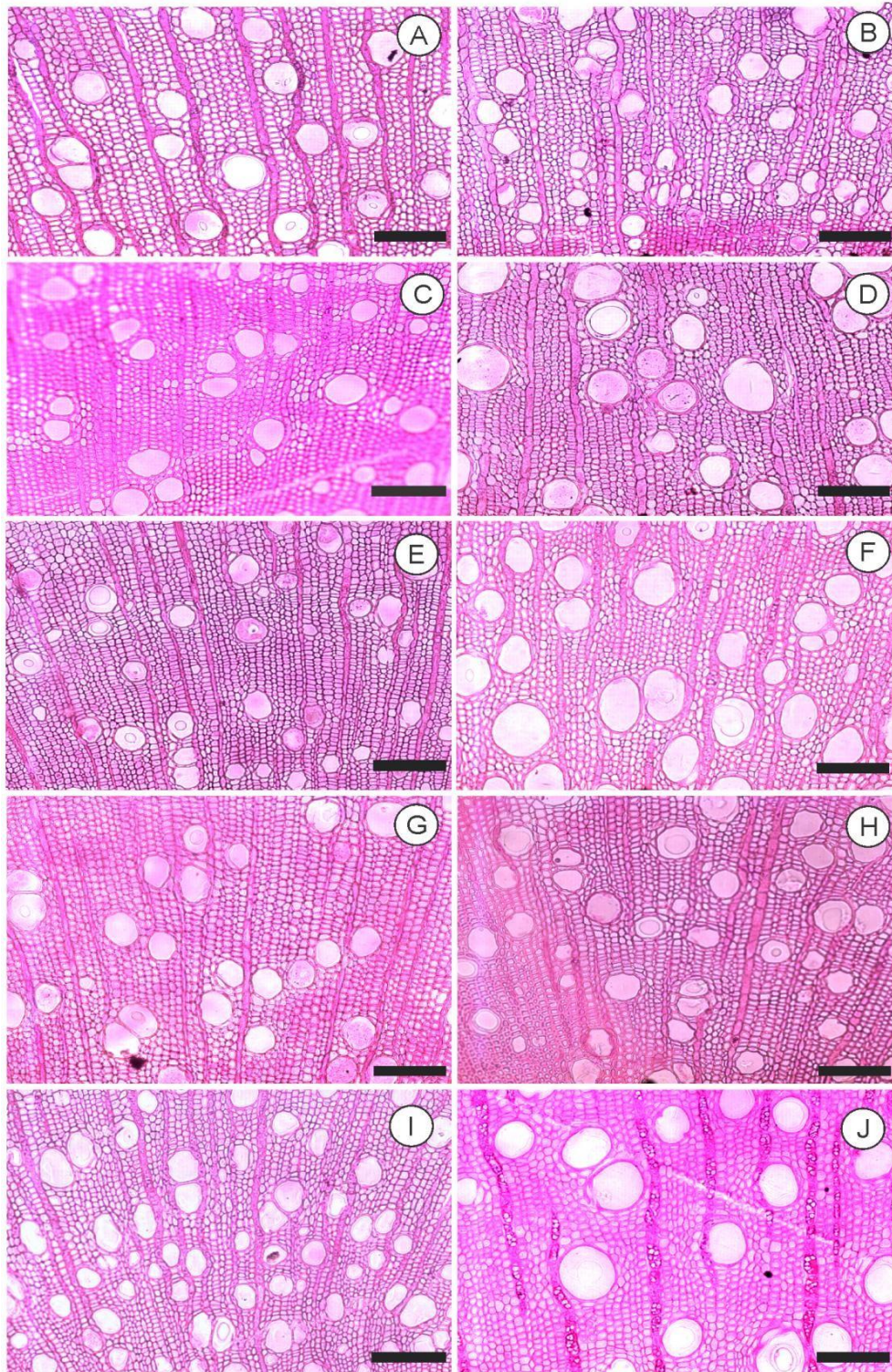




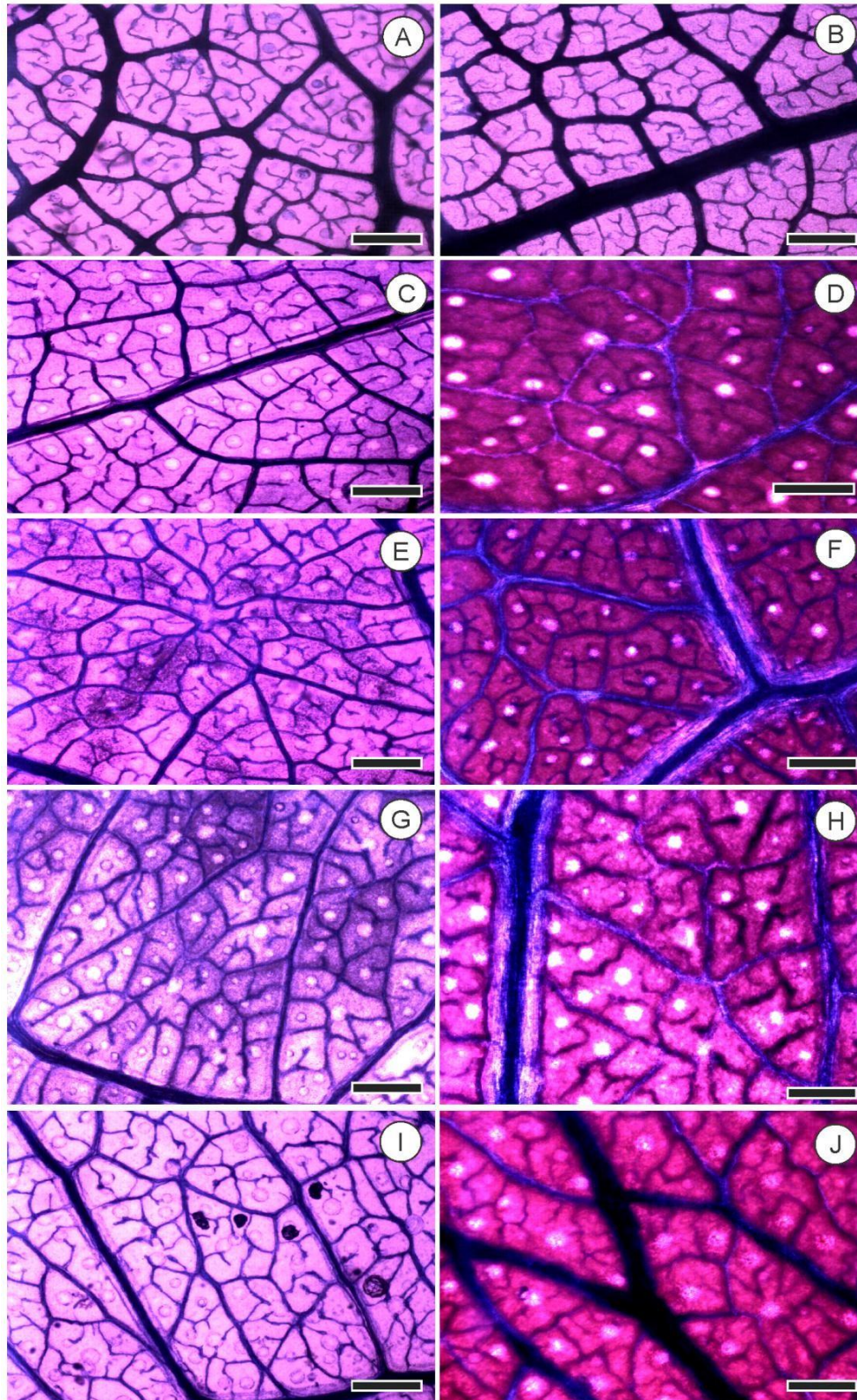
**Figura 2** - Concentração de Ca na folha (A), concentração de K na folha (B) concentração de Mg na folha (C) em 10 clones de eucalipto testados: 1 CL, 2 TC, 3 UR, 4 UR, 5 UR, 6 GU, 7 GU, 8 GU, 9 GU, 10 UC, nos tratamentos déficit hídrico (CC 50%) ■ controle (CC 90%) □ Médias com diferentes letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones dentro do tratamento déficit hídrico, diferentes letras minúsculas denotam diferenças significativas entre os clones para o tratamento irrigação adequada, e para o mesmo clone números diferentes denotam diferenças significativas entre os tratamentos (Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão da média.



**Figura 3** - Imagens da área foliar e corte transversal da folha dos clones 10 UC (A e B); 4 UR (C e D); 1 CL (E e F); 2 TC (G e H) e 6 GU (I e J) sob deficit hídrico. Barra das imagens escaneadas 4 cm e dos cortes 100μm.



**Figura 4** - Cortes anatômicos do caule primeira coluna plantas submetidas ao déficit hídrico, segunda coluna plantas com irrigação ideal. Os clones apresentados nas imagens são (A e B) 1 CL, (C e D) 2 TC, (E e F) 6 GU, (G e H) 9 GU e (I e J) 10 UC. barras=100 $\mu$ m.



**Figura 5** - Folhas diafanizadas primeira coluna plantas submetidas ao déficit hídrico, segunda coluna plantas com irrigação ideal. Os clones apresentados nas imagens são (A e B) 2 TC, (C e D) 7 GU, (E e F) 5 UR, (G e H) 6 GU e (I e J) 9 GU. barras=400µm.

## **Análise estatística multivariada**

### **Análise de componentes principais (PCA) (Déficit hídrico)**

Na Tabela 4 encontram-se os autovetores e a contribuição das variáveis originais nas três primeiras componentes principais, bem como a variância explicada por essas variáveis latentes. Observa-se que as três primeiras componentes principais apresentam os maiores autovalores e explicaram 72,04% da variância total dos dados.

Analisando-se a primeira componente principal observa-se que os maiores autovetores são, na sua maioria, negativos, referentes às características Fv/Fm, INALT e K. Entre os autovetores positivos, o de maior expressividade é o referente à característica CONDU. Logo, quanto menor for o valor da componente principal 1, maior o número de variáveis com interação significativa estarem sendo beneficiadas nessa componente principal.

Para a componente principal 2 observam-se que a maioria dos autovetores significativos são positivos para as variáveis: INDIAM, INVOL e Ca. Logo, como valores positivos significativos contemplam maior quantidade de variáveis, quanto maiores forem os valores dos escores dessa componente principal maior quantidade de variável de interesse em um processo de seleção estarão sendo contempladas.

Como utilizando somente as componentes principal 1 e 2 teríamos somente 58,11% da variação explicada, optou-se por introduzir também a componente principal 3, por ter contribuição significativa (13,92%) e pelo fato de três variáveis ainda possibilitarem a interpretação gráfica. Assim, para a componente principal 3 temos a seguinte observação: a maioria das variáveis com interação significativa nessa componente principal foram positivas, para as características ESEPSUP, ESEPINF e Mg. Assim, o ideal são valores maiores de escores para essa componente principal 3.

Diante dos autovetores obtidos, pode-se afirmar que as três primeiras componentes principais reúnem uma grande quantidade de características que podem ser relevantes para a seleção de clones de eucalipto para a produção em áreas com limitações hídricas. Nota-se que, com exceção das variáveis ARFOL, COMPNER e DENERV, todas as outras variáveis tm importância significativa em pelo menos um dos três componentes (CP1, CP2 e CP3), sendo que no componente principal 1 as duas maiores contribuições vêm das variáveis INALT e K, para a componente principal 2,

das variáveis DENESTON e INDIAM, e para a componente principal 3 , das variáveis ESEPINF e ESEPSUP.

**Tabela 4** - Autovetores nas três primeiras componentes principais.

Variáveis Originais	Autovetores		
	Componente 1	Componente 2	Componente 3
<b>FOTOS</b>	0,2315	0,0081	0,2119
<b>CONDU</b>	0,3154	-0,0586	-0,0421
<b>Fv/Fm</b>	-0,2857	0,2105	0,1199
<b>INALT</b>	-0,3384	0,0182	-0,0194
<b>INDIAM</b>	0,0161	0,4677	0,0443
<b>INVOL</b>	-0,1037	0,4409	-0,0342
<b>ARFOL</b>	0,2517	0,0914	0,1643
<b>Ca</b>	-0,0066	0,4093	0,0952
<b>K</b>	-0,3301	0,0447	0,1272
<b>Mg</b>	-0,2851	0,0317	0,2859
<b>ESPTOT</b>	0,2263	0,3378	-0,1151
<b>ESEPSUP</b>	0,1088	0,0011	0,4667
<b>ESEPINF</b>	0,0019	0,0583	0,5499
<b>ESMESO</b>	0,2047	0,3603	-0,1438
<b>DENESTON</b>	-0,2652	-0,745	0,2606
<b>QTDEV</b>	0,2541	-0,2853	0,0535
<b>DIAMEV</b>	-0,1608	0,0624	-0,3388
<b>COMPNER</b>	0,2543	0,1471	0,0745
<b>DENERV</b>	-0,2366	0,0014	-0,2373
<b>Autovalores</b>	7,3192	3,7198	2,6448
<b>Variância explicada</b>	38,5324	19,5835	13,9237
<b>Variância explicada acumulada</b>	38,5324	58,1156	72,0393

A Tabela 5 apresenta a matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das três primeiras componentes principais, para as variáveis avaliadas.

**Tabela 5** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das três primeiras componentes principais para as variáveis avaliadas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	2,0036								
3	1,7963	0,4799							
4	1,7835	0,8849	0,0658						
5	1,6074	0,7582	0,0476	0,0231					
6	1,4851	0,5957	0,1031	0,1222	0,1581				
7	1,0728	0,7473	0,1928	0,1661	0,1841	0,0410			
8	1,4517	1,0109	0,1548	0,0445	0,0879	0,0859	0,0702		
9	1,0791	0,7369	0,1417	0,1111	0,1093	0,0549	0,0127	0,0475	
10	1,0297	0,4095	0,1951	0,2942	0,2662	0,0756	0,0621	0,2278	0,0803

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

A dispersão dos clones de eucalipto (considerando os clones do gênero *eucalyptus* e *corymbia*) em função dos escores, diagrama de ordenação dos autovetores das três primeiras componentes principais, pode ser visualizada na Figura 6, em um plano com três dimensões (3D).

Avaliando a Figura 6, podemos observar um distanciamento no gráfico, em relação à maioria dos clones, dos clones 1, 2 e 10, que são sabidamente tolerantes a déficit hídrico em condição de campo, nos plantios comerciais no Nordeste da Bahia. Neste gráfico podemos observar o clone 2 (híbrido de *Corimbia citriodora* com *Corimbia Toreliana*) distante dos demais, ocupando o canto esquerdo do gráfico, sendo fortemente influenciado pela componente principal 1. Os clones 1 (*E. cloesiana*) e 10 (10 CU, híbrido de *E. urophylla* com *E. camaldulensis*), se posiciona um pouco menos distantes dos demais clones, mas ficam agrupados no centro do gráfico, estando sob maior influência das componentes principal 1 e 2. Essa diferença de posicionamento dos clones mais tolerantes a déficit hídrico na Figura 6, devido a estar sob influência de diferentes variáveis, sugere mecanismos diferentes de tolerância para estes três materiais genéticos pertencentes a espécies distintas do gênero *eucalyptus*.

Os baixos valores de dissimilaridade na Tabela 5, para o valor do quadrado da distância euclidiana, entre os clones 3 e 4 (0,0658), 3 e 5 (0,0476) e 4 e 5 (0,0231), indica similaridade de comportamento entre os mesmos. E essa similaridade é confirmada quando nos atentamos para o fato que se tratam de clones de mesma espécie, em que o clone 3 (3 UR), o clone 4 (4 UR) e o clone 5 (5 UR) são materiais genéticos de *E. urophylla*. Outro fato que reforça a proximidade entre os clones é que os

clones 3, 4 e 5, referem-se a materiais genéticos selecionados pela empresa Aperam em Itamarandiba-MG, ambos em condições ambientais muito similares.

Avaliando a Figura 6, também pode-se evidenciar uma separação entre o grupo de espécies por meio das três primeiras componentes principais 1, 2 e 3, posicionando os clones de *E. urophylla* (3,4 e 5) à direita e a baixa altura, os clones híbridos entre as espécies *E. grandis* e *E. urophylla* (6,7,8 e 9) à direita e mais acima no gráfico, e os clones tolerantes 1 (*E. cloeziana*), 2 (híbrido entre *Corymbia citriodora* e *Corymbia toreliana*) e 10 (híbrido entre *E. urophylla* e *E. camaldulensis*), localizados mais à esquerda no gráfico.

Essa informação, obtida pela interpretação da Figura 6, indica comportamento diferenciado, para as características avaliadas, entre as espécies de eucalipto e semelhantes entre clones dentro de uma mesma espécie. Diante disso, deve-se ter cuidado ao extrapolar interpretações de uma espécie de eucalipto para outra, quando, principalmente, se o trabalho não for a uma mesma condição ambiental.



**Figura 6** - Dispersão dos clones e das variáveis avaliadas em função dos escores respectivamente das três primeiras componentes principais.

## **Análise de Variáveis Canônicas (Déficit hídrico)**

A análise de variáveis canônicas foi utilizada, também, por ser um procedimento estatístico multivariado eficiente para avaliação do grau de similaridade entre os materiais genéticos em estudo (clones de eucalipto).

O objetivo principal dessa análise é proporcionar a simplificação estrutural dos dados, de forma que a divergência genética, influenciada, em princípio, por um conjunto com muitas variáveis, possa ser avaliada por um conjunto com poucas variáveis (variáveis canônicas), que são combinações lineares do conjunto maior, não correlacionadas e que possibilita uma avaliação gráfica bi ou tridimensional de fácil interpretação. Essas variáveis canônicas, são também denominadas de super variáveis, por representar mais de uma variável original de grande importância na explicação da diversidade entre os clones.

Na Tabela 6 encontram-se as estatísticas utilizadas na avaliação das nove variáveis canônicas, quando se comparou as 17 variáveis consideradas mais importantes desconsiderando as variáveis redundante, removendo assim INVOL (incremento % em Volume do caule) e ESPTOT (espessura total da epiderme). Para esta análise, a remoção de variáveis redundantes é importante para evitar o efeito de multicolinearidade.

Observa-se que as duas primeiras variáveis canônicas foram estatisticamente significativas, explicaram mais de 97% da variância total dos dados e apresentam elevado  $R^2$  canônico. Logo, as informações mais relevantes dos dados originais estão contidas nessas duas variáveis canônicas.

**Tabela 6** - Estatísticas utilizadas na avaliação das nove primeiras variáveis canônicas.

<b>Variável canônica</b>	<b>R<sup>2</sup> canônico</b>	<b>Autovalor</b>	<b>F aproximado</b>	<b>NS</b>	<b>VARE</b>	<b>VAREA</b>
1	0,891	9537,607	9,12	0,001	93,97	93,97
2	0,831	334,486	8,71	0,001	3,30	97,26
3	0,794	119,520	6,36	0,001	1,18	98,44
4	0,666	68,319	6,44	0,001	0,67	99,11
5	0,572	47,246	7,38	0,001	0,47	99,58
6	0,471	18,539	6,87	0,01	0,18	99,76
7	0,436	16,428	7,11	0,01	0,16	99,92
8	0,371	5,991	6,41	0,01	0,06	99,98
9	0,316	1,928	5,87	0,01	0,02	100,00

NS: Nível de Significância; VARE: Variância explicada (%); VAREA: Variância explicada acumulada (%)

Na Tabela 7 encontram-se os autovetores das variáveis originais nas três primeiras variáveis canônicas, bem como a variância explicada por essas variáveis.

Analisando a Tabela 7, as três variáveis originais de maior interação com as duas primeiras variáveis canônicas são: DIAMEV, FOTOS, INALT para a variável canônica 1, e Fv/Fm, INDIAM e DENERV, para a variável canônica 2. A maior quantidade de valores significativos para os autovetores foram obtidos para a variável canônica 1. A variável original que apresentou valores baixos para os autovetores para as duas variáveis canônicas foi a Ca, o que indica não ser uma variável importante na explicação da variação entre os materiais genéticos e, conseqüentemente, pouco importante no agrupamento e seleção de clones de eucalipto para tolerância a déficit hídrico.

**Tabela 7** - Autovetores das variáveis originais nas duas primeiras variáveis canônicas.

Variáveis Originais	Autovetor	
	Variável Canônica 1	Variável Canônica 2
<b>FOTOS</b>	-4,7582	1,1178
<b>CONDU</b>	-0,7278	-1,4338
<b>Fv/Fm</b>	-3,6129	2,4535
<b>INALT</b>	4,5849	-1,7644
<b>INDIAM</b>	0,8016	-2,2461
<b>ARFOL</b>	-1,2877	-0,6467
<b>Ca</b>	0,8274	-0,4241
<b>K</b>	4,1768	0,4129
<b>Mg</b>	-0,6761	1,4158
<b>ESEPSUP</b>	3,9331	0,8867
<b>ESEPINF</b>	-0,1218	-1,3823
<b>ESMESO</b>	-2,8273	-0,4165
<b>DENESTON</b>	-1,6921	0,4435
<b>QTDEV</b>	-2,3425	-0,9609
<b>DIAMEV</b>	5,3323	-0,4391
<b>COMPNER</b>	-1,6488	-0,3625
<b>DENERV</b>	4,1287	-2,2104
<b>Autovalores</b>	9537,61	334,49
<b>Variância explicada</b>	93,97	3,30
<b>Variância explicada acumulada</b>	93,97	97,27

Foram destacadas as variáveis INALT, Fv/Fm, ESEPSUP e DIAMEV que também foram identificadas como muito importantes na análise de componentes principais, confirmando a grande importância destas variáveis, na seleção de material genético para tolerância a déficit hídrico.

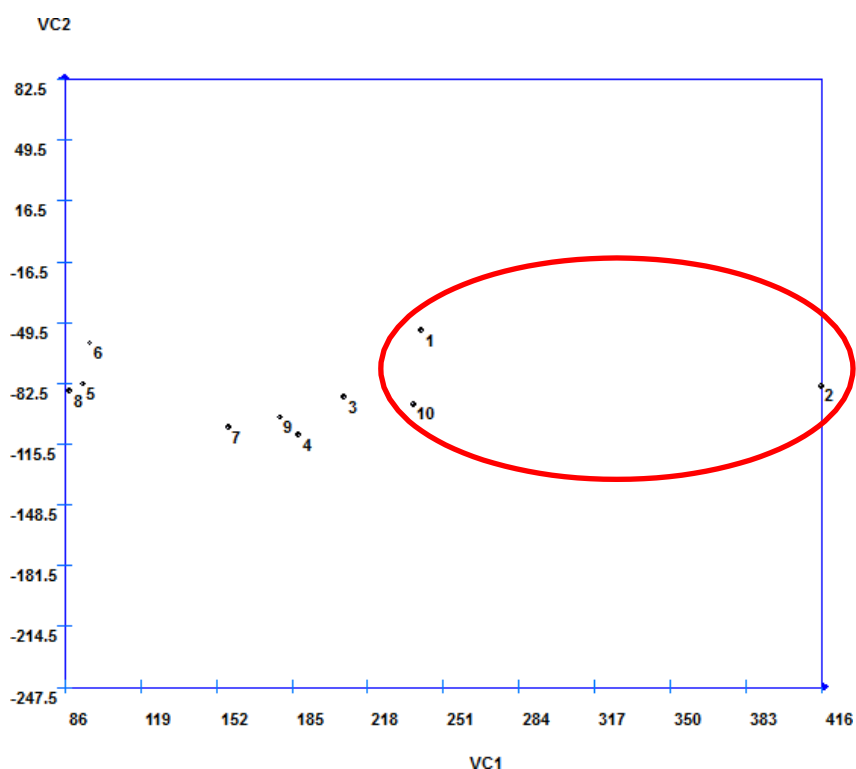
Para auxiliar a formação e separação de grupos similares de clones, com base nos escores referentes às três primeiras variáveis canônicas, também foi determinada a matriz de dissimilaridade entre os clones considerando a distância euclidiana quadrática, que pode ser observada na Tabela 8.

**Tabela 8** - Matriz de dissimilaridade entre os clones avaliados considerando os escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Clone	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,5621								
3	0,4144	0,4137							
4	1,0267	0,7048	0,1365						
5	0,4649	0,9655	0,1366	0,3214					
6	0,2093	1,1133	0,3799	0,8510	0,1530				
7	0,9235	0,7799	0,1082	0,0143	0,2093	0,6827			
8	0,5573	1,0027	0,1367	0,2685	0,0052	0,2131	0,1634		
9	0,7235	0,6086	0,0449	0,0297	0,1701	0,5668	0,0140	0,1401	
10	0,4960	0,3254	0,0131	0,1106	0,2305	0,5258	0,1097	0,2241	0,0471

Clones (referência): 1 (1 CL); 2 (2 TC); 3 (3 UR); 4 (4 UR); 5 (5 UR); 6 (6 GU); 7 (7 GU); 8 (8 GU); 9 (9 GU); 10 (10 UC)

Assim como foi constatado para componentes principais (Figura 6), avaliando a Figura 7 podemos novamente observar uma nítida separação entre os clones sabidamente tolerantes a déficit hídrico (clone 1, 2 e 10) na lateral direita do gráfico. Sendo a variável canônica 1 mais relevante no agrupamento desses três clones considerados tolerantes.



**Figura 7** - Dispersão dos clones em função dos escores das duas primeiras variáveis canônicas.

Como evidenciou a observação da Figura 7, a metodologia de análise por variáveis canônicas com exclusão de variáveis redundantes se mostrou tão eficiente quanto à análise por componentes principais, pois ambas conseguiram separar os clones 1, 2 e 10, que são tolerantes ao déficit hídrico, do restante do grupo de clones susceptíveis na representação gráfica.

### **Análise de Correlações canônicas (Déficit hídrico)**

Na Tabela 9, estão apresentados, para a condição de crescimento sob déficit hídrico, os coeficientes de correlação entre as variáveis do grupo 1 (FOTOS, CONDU, Fv/Fm, INALT, INDIAM, Ca, K e Mg) originais e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis do grupo 1, bem como a correlação entre as variáveis originais do grupo 2 (ARFOL, ESEPSUP, ESEPINF, ESMESO, DENESTON, QTDEV, DIAMV, COMPNER e DENERV) e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis do grupo 2.

Com base nos pares canônicos apresentados na Tabela 9, observou-se para o primeiro par canônico (U1,V1), que nenhuma variável apresentou valor significativo de correlação no grupo 1 e 2.

No segundo par canônico (U2,V2), valor significativo foi somente para a variável ESEPSUP no grupo 2.

No terceiro par canônico (U3,V3), em nenhum dos dois grupos tiveram variáveis com valores expressivos (maior que 0,60).

No quarto par canônico (U4,V4), houve correlação significativa apenas para a variável original INDIAM e Ca para o grupo 1, e ESMESO para o grupo 2.

No quinto par canônico (U5,V5), houve a maior quantidade de correlações significativas entre uma variável canônica e outra variável original, sendo que para o grupo 1 foram para as variáveis FOTOS, CONDU, INALT e K, e para o grupo 2, para as variáveis ARFOL, DENESTON e DENERV.

No sexto par canônico (U6,V6), houve correlação significativa somente no grupo 1, para as variáveis Fv/Fm e Mg.

No sétimo par canônico (U7,V7) e oitavo (U8, V8) não foi encontrada nenhuma variável com valor significativo de correlação para ambos os grupos.

**Tabela 9** - Correlação entre as variáveis originais de crescimento das mudas e as variáveis canônicas das combinações lineares das variáveis originais (Ui).

Variável	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8
<b>Grupo 1</b>								
FOTOS	0.02	-0.49	-0.23	-0.25	<u>-0.66</u>	0.07	0.10	0.44
CONDU	-0.02	-0.01	0.17	-0.19	<u>-0.97</u>	-0.03	0.00	0.05
Fv/Fm	-0.01	0.24	-0.40	0.15	0.58	<u>0.60</u>	-0.14	-0.20
INALT	0.14	0.21	0.32	0.16	<u>0.74</u>	0.50	-0.05	-0.04
INDIAM	0.05	-0.11	-0.31	<u>0.76</u>	-0.14	0.26	0.00	0.48
Ca	0.05	0.06	-0.31	<u>0.67</u>	-0.22	0.46	-0.11	-0.42
K	0.27	0.22	-0.13	-0.09	<u>0.70</u>	0.58	0.09	0.12
Mg	0.17	0.02	-0.29	-0.24	0.58	<u>0.69</u>	-0.15	0.01
Variável	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
<b>Grupo 2</b>								
ARFOL	0.14	-0.02	-0.21	-0.12	<u>-0.71</u>	0.06	-0.47	0.42
ESEPSUP	0.43	<u>-0.70</u>	-0.04	0.15	-0.08	-0.21	-0.43	-0.23
ESEPINF	0.57	-0.48	-0.49	0.02	0.16	-0.08	-0.26	-0.28
ESMESO	-0.22	0.11	-0.39	<u>0.66</u>	-0.48	-0.32	0.00	-0.14
DENESTO								
N	-0.04	-0.55	0.11	-0.13	<u>0.63</u>	0.52	-0.04	0.00
QTDEV	0.13	-0.07	0.39	-0.34	-0.53	-0.45	-0.33	-0.30
DIAMEV	-0.39	0.24	0.41	0.19	0.30	0.31	-0.04	0.58
COMPNER	-0.07	0.06	-0.35	0.00	-0.59	-0.16	-0.56	0.39
DENERV	-0.46	0.08	0.00	0.20	<u>0.77</u>	-0.18	0.20	-0.27

Valores sublinhados referem-se a correlações significativas a 5% e representam as variáveis que predominaram na explicação da variância total

## CONCLUSÕES

Os clones 10 UC e 2 TC, considerados os dois primeiros mais tolerantes em campo, apresentaram significativa diminuição na área foliar sob déficit hídrico, o que é também é um mecanismo de defesa da planta, para tolerância à escassez de água.

O clone 10 UC, considerado mais tolerante ao déficit hídrico em condição de campo, apresenta comportamento característicos com relação às variáveis analisadas, que confere ao mesmo maior tolerância ao déficit hídrico, como: menor área foliar, menor quantidade de vasos e maior espessura total do limbo foliar.

Para o agrupamento de clones tolerantes a déficit hídrico, levando-se em consideração as variáveis deste estudo, ambos os métodos, análise por componentes principais e análise de variáveis canônicas, foram eficientes em apresentar um resultado similar ao que se observa em campo em plantios comerciais, agrupando e separando os clones susceptíveis dos tolerantes ao déficit hídrico. Sendo que, por esta análise, interpretamos que as variáveis mais aplicáveis à separação de clones para tolerância foram, CONDU, Fv/Fm, Ca, ESEPSUP e DIAMEV.

## Referências

Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, et al.. (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management Elsevier*, 259:660- 684

Allen CD, Breshears DD, McDowell NG (2015) On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 8:129

Allen CD (2015) Forest ecosystem reorganization underway in the Southwestern US: A preview of widespread forest changes in the Anthropocene? In V. A. Sample, R. P. Bixler, and C. Miller, editors. *Forest conservation and management in the Anthropocene: adaptation of science, policy and practices*. University Press of Colorado, Boulder, Colorado, in press.

Anderegg WR, Berry JA, Smith DD, Sperry JS, Anderegg LD, Field CB (2012). The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1: 233-237

Anderegg LD, Anderegg WR, Berry JA (2013) Not all droughts are created equal: translating meteorological drought into woody plant mortality. *Tree physiology* 7:0-30

Battie-Laclau P, Laclau JP, Domec JC, Christina M, Bouillet JP, Piccolo MC, Gonçalves JLM, Moreira RM, Krusche AV, Bouvet JM, Nouvellon Y (2014) Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytologist* 203:401-413

Bartlett MK, Scoffon, C, Sack L (2012). The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecology Letters*, 15:393-405

Battie-Laclau P, Laclau JP, Beri C, Mietton L, Muniz M R A, Arenque BC, Nouvellon Y (2014) Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. *Plant, Cell & Environment* 37:70-81

Boisier JP, Ciais P, Ducharne A, Guimberteau M (2015) Projected strengthening of Amazonian dry season by constrained climate model simulations. *Nature Climate Change*, 7:0-656

Bourne AE, Haigh AM, Ellsworth DS (2015) Stomatal sensitivity to vapour pressure deficit relates to climate of origin in *Eucalyptus* species. *Tree Physiology* 35:266-278

Breshears DD, Myers OB, Meyer CW, Barnes FJ, Zou CB, Allen CD, Pockman WT (2009) Tree die-off in response to global change-type drought: mortality insights from a decade of plant water potential measurements. *Frontiers in Ecology and the Environment* 4:185-189

Brienen RJ, Phillips OL, Feldpausch TR, Gloor E, Baker TR, Lloyd J, Martinez RV (2015) Long-term decline of the Amazon carbon sink. *Nature* 7543:0-344

Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant physiology* 4:1890-1898

Cassel DK, Nielsen DR (1986) Field capacity and available water capacity. *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods*, (methodsofsoilan1), 1:901-926

Choat B, Jansen S, Brodribb T J, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Jacobsen AL (2012) Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 7426:0-752

Christina M, Maire GL, Battie-Laclau P, Nouvellon Y, Bouillet JP, Jourdan C, Gonc JLM, Laclau AJP (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *Global Change Biology* 21:2022–2039

Cruz CD (2013) Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy* 3: 271-276

Galiano L, Martínez-Vilalta J, Sabaté S, Lloret F (2012) Determinants of drought effects on crown condition and their relationship with depletion of carbon reserves in a Mediterranean holm oak forest. *Tree physiology* 4:478-489

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1:87-92

Hartmann DL, Tank AMK, Rusticucci M, Alexander LV, Brönnimann S, Charabi YA R, Soden BJ (2013) Observations: atmosphere and surface. In *Climate Change 2013 the Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.

JADOSKI C (2012) Efeitos fisiológicos da piraclostrobina em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) condicionado sob diferentes tensões de água no solo. 2012. 80f (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Agronomia)—Universidade Estadual Paulista, Botucatu).

Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, Inc.; London.

Malavolta, E. (1997). Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira.—2. ed., ver. e atual. Piracicaba: Potafos.

Marin, A.R., Pezeshki, S.R., Masschelen, P.H. and Choi, H.S., (1993). Effect of dimethylarsenic acid (DMAA) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *Journal of Plant Nutrition*, 16(5), pp.865-880.

McAdam SA, Brodribb TJ (2015) The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapour pressure deficit. *Plant Physiology*, pp-114.

McDowell NG (2011) Mechanisms linking drought, hydraulics, carbon metabolism, and vegetation mortality. *Plant physiology*3:1051-1059

O'brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 2:368-373

Reichstein M, Bahn M, Ciais P, Frank D, Mahecha MD, Seneviratne SI, Papale D (2013). Climate extremes and the carbon cycle. *Nature* 7462:0-287

Rowland L, da Costa ACL, Galbraith DR, Oliveira RS, Binks O J, Oliveira AAR, Ferreira LV (2015) Death from drought in tropical forests is triggered by hydraulics not carbon starvation. *Nature* 7580:0-119

Strittmatter, G. and Wegener, D., (1973). Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: present state of the art. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 48(9-10), pp.673-688.

Wadt PGS, NOVAIS RD, ALVAREZ VVH, Fonseca S, BARROS ND (1998) Valores de referência para macronutrientes em eucalipto obtidos pelos métodos DRIS e chance matemática. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 22: 685-692

## CONCLUSÕES GERAIS

A partir do conjunto de resultados das análises de crescimento, fisiológicas e bioquímicas obtido para os dez genótipos de eucalipto nas condições experimentais avaliadas, e para as metodologias utilizadas, foi possível concluir que:

As variáveis: peso total da planta, incremento em altura %, teor relativo de água são úteis na seleção e para essas análises são necessários apenas balança, estufa e fita métrica. Para as variáveis fotossíntese, FV/FM e condutância é necessário apenas o uso do IRGA, dessa forma essas variáveis podem ser facilmente usadas nas empresas para a seleção de indivíduos com potencial para serem tolerantes em campo.

O clone 10 CU é o genótipo de eucalipto mais tolerante ao déficit hídrico, por apresentar maior eficiência no uso da água, mecanismos antioxidativos e de ajustamento osmótico mais robustos. Demonstrando ser um genótipo tolerante ao déficit hídrico, confirmando o que já se encontra estabelecido na literatura. Esse genótipo pode ser utilizado para a melhoria da tolerância à seca em eucalipto, por meio de cruzamentos e outras abordagens do Melhoramento Genético de Plantas.

Para o agrupamento de clones tolerantes a déficit hídrico, levando-se em consideração as variáveis do presente trabalho, ambos os métodos, análise por componentes principais e análise de variáveis canônicas, foram eficientes em apresentar um resultado similar ao que se observa em campo em plantios comerciais, agrupando e separando os clones suscetíveis dos tolerantes ao déficit hídrico.