

FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E METABÓLICOS ENVOLVIDOS NA
TOLERÂNCIA À SECA EM EUCALIPTO**

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

Orientador: Wagner Luiz Araújo

Coorientadores: Adriano Nunes Nesi
Auxiliadora Oliveira Martins
Ivo Ribeiro da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

Oliveira, Franciele Santos, 1992-
O48a Aspectos morfoanatômicos e metabólicos envolvidos
2021 na tolerância à seca em eucalipto / Franciele Santos Oliveira. –
Viçosa, MG, 2021.

99 f.: il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Anatomia. 2. Indicadores biológicos.
3. Déficit hídrico. 4. Eucalipto - Metabolismo. 5. Eucalipto
–Morfologia. 6. Eucalipto – Seleção. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA

**ASPECTOS MORFOANATÔMICOS E METABÓLICOS ENVOLVIDOS NA
TOLERÂNCIA À SECA EM EUCALIPTO**

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: 06 de abril de 2021.

Assentimento:


Franciele Santos Oliveira
Autora


Wagner Luiz Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e sempre, agradeço a Deus por ser meu amigo, sustento e proteção. E claro, a doce Virgem Maria por ser esse colo materno e amparo acolhedor.

Aos meus pais, Amélia e Carlos (in memorium), que são meus exemplos de vida e que formaram a pessoa que sou. Agradeço pelo amor, respeito e simplicidade para conquistar os objetivos. Essa conquista é nossa!! As minhas irmãs Michely e Joyce, pela paciência, amor e por dividir comigo esses momentos.

Ao meu orientador, Wagner L. Araújo, por me orientar desde a graduação e por todo aprendizado ao longo desses anos. Agradeço pelas oportunidades, incentivos e pela paciência no decorrer dessa caminhada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em especial ao professor Adriano Nunes-Nesi, pela contribuição e ensinamentos.

Ao professor Glêison dos Santos, pela oportunidade e confiança de fazer parte do “Projeto Tolerância à Seca” e também seu time. Vamos em frente!

Ao professor Nairam Barros, pelas contribuições e conhecimentos.

A CENIBRA e, em particular, ao Dr. Fernando Palha Leite pela participação e contribuição no projeto.

As empresas participantes do Projeto, sendo elas: Aperam, Bracell, Cenibra, CMPC, Duratex, Eldorado, Gerdau, International Paper, Klabin, Vallourec, Veracel e Suzano.

A Dora, pela amizade, aprendizado e pelos anos de trabalho na UCP.

Aos bolsistas (privilegiados) Karla, Robson, Gabriel e Sérgio, que foram de fundamental importância para realização deste trabalho e que se tornaram grandes amigos!

Aos meus queridos amigos e colegas Luana, Jessica, Jonas, Pablo, Karla e Regiane, pelos bons momentos compartilhados e por tornar a caminhada mais leve. Amo vocês!

Aos amigos e colegas da UCP, pelo apoio, convivência e aprendizados. A todos que achavam que a frase “o que você vai fazer amanhã?” era um convite para evento, quando era, na verdade, um “convite” para trabalhar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, à Universidade Federal de Viçosa e à Sociedade de Investigações Florestais (SIF) pela formação e por disponibilizar sua estrutura e recursos para a realização dos experimentos.

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

RESUMO

OLIVEIRA, Franciele Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2021. **Aspectos morfoanatômicos e metabólicos envolvidos na tolerância à seca em eucalipto**. Orientador: Wagner Luiz Araújo. Coorientadores: Adriano Nunes Nesi, Auxiliadora Oliveira Martins e Ivo Ribeiro as Silva.

A deficiência hídrica afeta diferentes culturas levando a perdas de produtividade em todo o mundo. Perdas expressivas foram observadas no Brasil, particularmente em 2014, em áreas ocupadas por plantios de eucalipto em função da limitação hídrica, ocasionando quedas significativas de produtividade. Em razão desses efeitos, estudos foram conduzidos para compreender os mecanismos expressados por eucalipto para tolerar à seca, tendo em vista que existem plantas que apresentam respostas diferentes ao estresse (plantas tolerantes, intermediárias e sensíveis). Nesse contexto, o presente trabalho buscou investigar os impactos morfológicos e metabólicos em clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à seca, a fim de se avaliar as estratégias adotadas por tais materiais e identificar possíveis bioindicadores de tolerância à seca. Três experimentos foram realizados para prospectar bioindicadores (capítulo 1 e 2) e validá-los em campo (capítulo 3). No primeiro capítulo, 12 clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à seca (tolerantes e sensíveis) foram analisados em resposta a dois regimes hídricos: a) solo com umidade próxima à 100% da capacidade de campo (CC-controle) e b) solo com umidade próxima a 65% da capacidade de campo (SM-seca moderada). Sob condição de SM, a biomassa da parte aérea foi reduzida na maioria dos clones, ao passo que avaliações termográficas mostraram que determinados clones de eucalipto tolerantes à seca apresentam temperatura foliar semelhante a plantas controle (plantas irrigadas). Na maioria dos clones, observou-se que aminoácidos solúveis totais, proteínas solúveis totais, glicose e frutose sofreram incrementos em resposta à SM. Ademais, clones tolerantes foram os únicos a apresentar estômatos nas duas faces (anfiestomáticos). A anatomia das folhas e do pecíolo permitiu diferenciar clones mais e menos tolerantes ao déficit hídrico. No capítulo 2, foram utilizados clones que se destacaram nas avaliações do capítulo 1 para validar o que foi encontrado no experimento anterior e identificar outros possíveis bioindicadores de tolerância à seca em eucalipto. Para isso, utilizaram-se cinco clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à seca (tolerantes e sensíveis) em blocos casualizados, num esquema

fatorial 5x2 (5 clones de eucalipto e 2 regimes hídricos- controle [solo mantido com umidade próxima à 100% da capacidade de campo (CC-controle)] e solo com umidade próxima à 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada). Após um período de 120 dias sob esses dois tratamentos, as plantas submetidas a SM foram expostas a seca severa (SS) (potencial hídrico próximo a -3Mpa) e em seguida reidratada – RI. Foi possível observar que os clones avaliados apresentaram reduções nas trocas gasosas sob a condição SM, entretanto, recuperaram a valores similares ao controle após reidratação. A avaliação termográfica pode ser uma importante ferramenta para auxiliar na discriminação dos genótipos. Acúmulos de aminoácidos livre totais e açúcares foram também observados em plantas submetidas ao déficit hídrico (SS). A área foliar específica, densidade estomática, espessura dos tecidos e diâmetro dos vasos do xilema são alterados em plantas sob seca. Uma vez selecionados os bioindicadores em casa de vegetação nos capítulos 1 e 2, o capítulo 3 teve como objetivo validá-los em campo. Para isso, utilizaram-se 28 progênies oriundas de cruzamentos de clones considerados tolerantes e produtivos cultivados em local que apresenta baixa precipitação anual e que passam por longos períodos de estiagem (Buritizeiro-MG). As coletas de folhas foram realizadas após 6 e 18 meses de plantio no campo e determinou-se variáveis morfológicas (área foliar específica, área foliar individual, comprimento e largura foliar) e status hídrico (potencial hídrico foliar ao meio-dia e na antemã). O delineamento experimental utilizado foi o single tree plot e cinco repetições. Em síntese, observou-se a expressão de diferentes mecanismos de tolerância à seca, no que se refere à ajustes foliares. Valores de características mensuradas em diferentes épocas mostraram correlação significativa entre si, indicando persistência ao longo do período de avaliações e possível potencial como bioindicadores de tolerância. Tal fato reforçaria a utilização de bioindicadores de tolerância à seca como uma estratégia para seleção de materiais de eucalipto em programas de melhoramento genético florestal.

Palavras-chave: Anatomia. Bioindicadores. Déficit hídrico. Metabolismo. Morfologia. Seleção precoce.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Franciele Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2021 **Morphoanatomic and metabolic aspects involved in drought tolerance in eucalyptus.** Advisor: Wagner Luiz Araújo. Co-advisers: Adriano Nunes Nesi, Auxiliadora Oliveira Martins and Ivo Ribeiro as Silva.

Drought affects different crops leading to significant yield losses worldwide. In Brazil, significant losses are usually observed in responses to drought events and, particularly in 2014, areas with eucalyptus plantations were strongly affected due to water limitations, causing significant productivity drops. Accordingly, studies seeking to understand the mechanisms used by eucalyptus plants to tolerate drought were explored, since there are plants that present differential responses to drought (tolerant, intermediate, and sensitive plants). The present research sought to investigate the morphological and metabolic alterations in eucalyptus clones with differential drought tolerance. The main goal was to evaluate the strategies adopted by such materials and to identify possible bioindicators of drought tolerance. Three experiments were carried out to prospect bioindicators (chapters 1 and 2) and validate them under field conditions (chapter 3). In chapter 1, 12 eucalyptus clones with different levels of drought tolerance (tolerant and sensitive) were analyzed in response to two water regimes [(soil near to 100% of field capacity (CC-control)) and moderate drought soil maintained at 65 % of FC (MD-moderate drought)]. Shoot biomass was reduced in most of the evaluated clones whereas thermographic evaluations showed that certain drought-tolerant eucalyptus clones display leaf temperature similar to control plants (irrigated plants). In most of the clones evaluated, it was observed that total soluble amino acids, total soluble proteins, glucose, and fructose increased in response to drought. Furthermore, only tolerant clones have stomata on both sides (amphistomatic). By analyzing the anatomy of both leaves and petiole, it was possible to verify the intrinsic effects of genetic materials, as well as the effect of moderate drought. In chapter 2, 5 clones that stood out in the evaluations performed in chapter 1 were used to validate the results found in the previous experiment and to further identify other possible bioindicators of drought tolerance in eucalyptus. For this, 5 eucalyptus clones with different levels of drought tolerance (tolerant and sensitive) were used in randomized blocks in a 5x2 factorial scheme (5 eucalyptus clones and 2

water-control regimes [soil kept near to 100% of field capacity (CC-control)] and soil with moisture close to 70% of field capacity (SM-moderate dry). After a period of 120 days under these two treatments, plants subjected to SM were exposed to severe drought (SS) (water potential close to -3Mpa) and then rehydrated – RI. The evaluated clones were characterized by a reduction in gas exchange under drought conditions; however, they reached values similar to the control after rehydration. Thermographic analyzes seems to be an important tool to assist in the discrimination of genotypes. Accumulation of total free amino acids and sugars was observed in drought-stressed plants. Specific leaf area, stomatal density, tissue thickness, and xylem vessel diameter are altered in response to drought. Once the bioindicators in the greenhouse were selected in chapters 1 and 2, we further validate them under field conditions (chapter 3). For this, 28 progenies from crosses of clones considered tolerant and productive were cultivated in a place that has low annual precipitation and that suffers greatly from periods of drought (Buritizeiro-MG). Leaf sampling was carried out at 6 months and 18 months of planting and morphological variables (specific leaf area, individual leaf area, leaf length, and width) and water status (leaf water potential at noon and in the morning) were determined. The experimental design used was a single tree plot and 5 repetitions. Briefly, different mechanisms adopted for drought tolerance, concerning leaf adjustments, were observed. In addition, an adequate correlation between harvesting samples over the evaluation period was observed. It should also be noted that the search for bioindicators of drought tolerance performed here has proved to be a promising strategy for the selection of eucalyptus materials in forest genetic improvement programs.

Keywords: Anatomy. Bioindicators. Water deficit. Metabolism. Morphology. Early selection.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO I.....	14
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E METABÓLICAS EM CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS À SECA.....	14
1- INTRODUÇÃO	14
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1- Seleção dos materiais genéticos e condução do experimento	15
2.2- Avaliações biométricas e quantificação de biomassa.....	16
2.3- Avaliações termográficas.....	17
2.5- Determinação de pigmentos, açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido e proteínas solúveis totais	17
2.6- Densidade estomática	17
2.7- Variáveis anatômicas.....	18
2.8- Análise estatística.....	18
2.9- Análise de componentes principais (PCA).....	18
3- RESULTADOS.....	19
3.1- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono	19
3.2- Avaliações termográficas	24
3.3- Mudanças metabólicas em resposta à disponibilidade hídrica	25
3.4- Impactos anatômicos em folhas sob déficit hídrico.....	28
4- DISCUSSÃO	33
5- CONCLUSÕES	39
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II.....	44
IDENTIFICAÇÃO DE BIOINDICADORES DE TOLERÂNCIA À SECA EM EUCALIPTO CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	44

1- INTRODUÇÃO	44
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1- Seleção dos materiais genéticos e condução do experimento	46
2.2- Avaliações biométricas e quantificação de biomassa.....	47
2.3- Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a	47
2.4- Avaliações termográficas.....	48
2.5- Determinação dos teores de pigmentos, açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido e proteínas solúveis totais	48
2.6- Determinação da área foliar específica	48
2.7- Densidade estomática por diafanização	49
2.8- Variáveis anatômicas.....	49
2.9- Análises nutricionais	49
2.10- Análise estatística.....	49
2.11- Análise de componentes principais	50
3- RESULTADOS.....	50
3.1- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono	50
3.2- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono	54
3.3- Termografia em plantas sob seca	57
3.4- Impactos metabólicos em clones de eucalipto sob seca e recuperação	58
3.4- A deficiência hídrica moderada promove alterações morfoanatômicas	62
3.5- Avaliação nutricional de plantas sob déficit hídrico	65
4- DISCUSSÃO	69
5- CONCLUSÕES	73
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO III.....	77
MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À SECA DE PROGÊNIES EM CAMPO ...	77
1- INTRODUÇÃO	77

2- MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1- Potencial hídrico foliar na antemanhã e ao meio-dia	80
2.2- Avaliações termográficas.....	81
2.3- Determinação de variáveis morfológicas (área foliar específica, área foliar, comprimento e largura foliar)	81
2.4- Comparação entre duas metodologias para determinação de área foliar específica.....	81
2.5- Análise estatística.....	81
3- RESULTADOS.....	82
3.1- Avaliações morfológicas aos 6 meses (Ano 2019)	82
3.2- Avaliações morfológicas aos 18 meses (Ano 2020)	87
3.3- Comparações morfológicas entre plantas aos 6 meses e 18 meses..	93
4- DISCUSSÃO	94
5- CONCLUSÕES	97
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
7- CONCLUSÕES GERAIS.....	99

INTRODUÇÃO GERAL

A seca, estresse multidimensional que acomete grandes culturas, compromete inúmeros processos vitais das plantas, requerendo que essas desenvolvam ajustes fisiológicos, metabólicos e morfológicos para suportar a restrição hídrica (Lisar et al., 2012). No ano de 2014, aproximadamente 150.000 hectares de florestas plantadas de eucalipto no estado de Minas Gerais foram perdidos em decorrência da limitada disponibilidade hídrica (Diário do Comércio, 2015).

Os cultivos de eucalipto têm se expandido para regiões com baixos índices pluviométricos, o que tem causado, em algum grau, prejuízos às empresas florestais em decorrência de déficit hídrico. Nesse particular, a seca ocorrida em 2014 causou grandes prejuízos, e o evento tem se sucedido em anos mais recentes. Isso tem motivado as empresas a buscarem materiais mais tolerantes à seca, e a tentarem elucidar os possíveis mecanismos de tolerância à seca em eucalipto, para melhor explorar o potencial produtivo dos materiais (Vivas et al., 2019). Para tanto, a estratégia principal do nosso trabalho é identificar genótipos de eucalipto com diferentes graus de tolerância à seca, desde mais materiais tolerantes a materiais mais sensíveis, definindo características potenciais para seleção precoce, denominadas de biomarcadores. Trabalhos realizados nessa linha (Corrêa et al. 2017; Hodecker et al., 2018 e Hodecker, 2015) indicam a possibilidade dessa identificação em eucalipto, ainda que a tolerância ao déficit hídrico esteja associada ao declínio da taxa de fotossíntese e consequente redução no crescimento (Correia et al., 2016).

Alterações metabólicas também ocorrem em plantas sob limitação hídrica, como acúmulo de açúcares que são importantes para aumentar a tolerância nesta condição (Hamanishi et al., 2015; Correia et al., 2016). Além disso, a morfologia foliar pode apresentar modificações importantes para garantir a sobrevivência. Dentre as modificações destaca-se; alteração no número de estômatos, aumento da espessura de tecidos e adensamento celular (Gomes 2013; Bertolino et al., 2019).

A fenotipagem em campo é um procedimento também comum na identificação de materiais genéticos mais tolerantes à restrição hídrica. No entanto, entender como as espécies de eucalipto e seu local de origem podem auxiliar na seleção à tolerância à seca é de grande utilidade prática. Nesse sentido, o *E. camaldulensis*, por exemplo, tido como tolerante e originário da Austrália, é encontrado entre as latitudes 15.5 ° a

38.0 ° S, altitudes entre 30 a 600 metros e caracteriza-se como uma espécie frequentemente encontrada às margens de rios, sob condições naturais, a precipitação média anual varia entre 250 a 650 mm. A espécie tolera geadas que ocorrem na região sul do continente australiano e, nas regiões tropicais, com secas extremas, pode suportar até oito meses sem chuva. Da mesma forma, *E. grandis*, também originário da Austrália, é encontrado ao norte do estado de New South Wales, e nas regiões central e norte de Queensland. A precipitação pluviométrica varia entre 1.000 a 3.500 mm anuais, predominantemente no verão, e a estação seca raramente ultrapassa três meses, sendo, pois, considerado sensível à seca. O *E. urophylla* ocorre naturalmente na ilha de Timor e em outras ilhas a leste do arquipélago indonésio. A precipitação pluviométrica média anual varia de 1.000 a 1.500 mm, com chuvas concentradas no verão, sendo considerado medianamente tolerante à seca. Destaca-se, também, que o período seco usualmente não ultrapassa quatro meses (Revista da Madeira, 2001).

Os materiais genéticos utilizados no presente trabalho foram classificados em tolerantes e sensíveis de acordo com observações de campo, que consideraram a sobrevivência. Os experimentos indicam que a base genética dos clones mais tolerantes envolve a presença do *E. camaldulensis*, fato compatível com a origem dessa espécie. Desse modo, este trabalho buscou identificar de forma detalhada, possíveis bioindicadores de tolerância à seca em casa de vegetação e sua posterior validação em campo, por meio da realização de três experimentos. Os dois primeiros experimentos realizados em casa de vegetação objetivaram entender os mecanismos de tolerância expressos pelos clones de eucalipto reconhecidamente tolerantes à seca. Já o terceiro experimento foi realizado com progênies oriundas de cruzamentos entre espécies consideradas tolerantes e produtivas para validação dos bioindicadores em campo. Alinhar as informações obtidas em casa de vegetação e campo poderá auxiliar programas de melhoramento genético através da seleção precoce.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertolino LT, Caine RS, Gray JE (2019) Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Frontiers Plant Science* 10: 225.

Corrêa TR, Picoli EAT, de Souza GA, Condé SA, Silva NM, Lopes-Mattos KLB, de Resende MDV, Zauza EAV, Oda S (2017) Phenotypic markers in early selection for tolerance to dieback in *Eucalyptus*. *Industrial Crops and Products* 107: 130–138.

Correia B, Valledor L, Hancock RD, Renaut J, Pascual J, Soares AMVM, Pinto G (2016) Integrated proteomics and metabolomics to unlock global and clonal responses of *Eucalyptus globulus* recovery from water deficit. *Metabolomics* 12: 141.

Diário do comércio. Disponível em: <http://diariodocomercio.com.br/sitenovo/silvicultura-perde-cerca-de-150-milhectares-com-a-seca/>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

Gomes LML. Características morfofisiológicas associadas à restrição hídrica em clones de eucalipto. 37 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

Hamanishi ET, Barchet GLH, Dauwe R, Mansfield SD, Campbell MM (2015) Poplar trees reconfigure the transcriptome and metabolome in response to drought in a genotype-and time-of-day-dependent manner. *BMC Genomics* 16: 329.

Hodecker BER (2015) Comparison of drought stress responses of tolerant and sensitive *Eucalyptus* genotypes. University of Viçosa, Minas Gerais-Brasil.

Hodecker BER, Pita-Barbosa A, Barros NF, Merchant A (2018) Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. *New Forests* 49: 173–195.

Lisar SYS, Motafakkerzad R, Hossain MM, Rahman IMM (2012) Water stress in plants: causes, effects and responses. 10:5772/39363.

Revista da Madeira. Disponível em: http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=9&subject=Esp%E9cies&title=Esp%E9cies%20de%20Eucalipto. Acesso em: 03 de janeiro 2021.

Vivas M, Rolo V, Wingfield MJ, Slippers B (2019) Maternal environment regulates morphological and physiological traits in *Eucalyptus grandis*. *Forest Ecology and Management*, 432: 631-636.

CAPÍTULO I

ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E METABÓLICAS EM CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS À SECA

1- INTRODUÇÃO

A deficiência hídrica afeta inúmeros processos em plantas, impactando, dentre outras características, a produção de biomassa e área foliar (Pita e Pardos, 2001; Maseda & Fernández, 2016). Além disso, alterações metabólicas podem ser evidenciadas incluindo reduções de hexoses fosfatadas, aumentos no conteúdo de amido e aminoácidos livres, como observados em *E. globulus* (Correia et al., 2018). Em adição, alguns açúcares, rafinose e galactinol, são acumulados em plantas sob seca e auxiliam no ajustamento osmótico, como observado em *Populus* (Hamanishi et al., 2015), e frutose, galactose, xilose, arabinose e mio-inositol em *E. globulus* (Correia et al., 2016).

Não apenas alterações metabólicas, mas também mudanças morfológicas são importantes para tolerância ao déficit hídrico. O número de estômatos, por exemplo, é uma variável influenciada por fatores genéticos e/ou ambientais (Bertolino et al., 2019), e pode auxiliar na seleção de materiais tolerantes à deficiência hídrica. Características anatômicas são importantes para compreensão das estratégias adotadas pelas plantas em resposta à limitada disponibilidade hídrica. Assim, sob limitação hídrica, observa-se diminuição na densidade estomática, decréscimos dos espaços intercelulares, duas ou mais camadas de parênquima paliçádico (Gomes 2013), aumento na densidade de venação (Boer et al., 2016), dentre outras modificações. A anatomia dos vasos condutores também permite compreender as estratégias adotadas pelas plantas sob condições de limitação hídrica, a fim de obter melhor segurança hidráulica. (Saadaoui et al. 2017) ao estudarem a anatomia de 28 espécies de eucalipto distribuídas na Austrália observaram que, à medida que a aridez aumentava, ocorreu diminuição dos diâmetros dos vasos com simultâneo aumento da frequência dos mesmos.

De modo geral, os trabalhos realizados até o presente momento permitem, de certo modo, a separação de clones (tolerantes e sensíveis). No entanto, pouco tem

sido abordado sobre a identificação de possíveis bioindicadores de tolerância à seca que podem ser utilizados precocemente, seja em casa de vegetação ou viveiro ou em condições de campo. A identificação desses bioindicadores de tolerância à seca fornecerá a base para estudos dos mecanismos expressos por cada material e auxiliará em programas de melhoramento genético por meio da seleção precoce.

Nesse contexto, o presente trabalho investigou as alterações morfológicas e metabólicas causadas pela restrição hídrica em clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à seca, em casa de vegetação, a fim de identificar possíveis bioindicadores de tolerância à seca para plantio em condições de campo.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Seleção dos materiais genéticos e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45 'S e 42°52 'W, 672 m) sob condições semi controladas. Foram selecionados doze clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à deficiência hídrica (tolerantes e sensíveis) de acordo com o ranking de sobrevivência realizado pelas empresas do setor florestal (Tabela 1).

Tabela 1: Clones utilizados no experimento. Em azul, clones considerados tolerantes e em vermelho, clones sensíveis à seca, de acordo com o ranking realizado em condições de campo.

Clones	Cruzamentos
VM01	E. urophylla x E. camaldulensis
CO1275	E. camaldulensis x E. spp
CO1445	E. urophylla x E. camaldulensis
CO1277	E. grandis x E. camaldulensis
AEC2034	E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)
AEC2197	E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)
AEC3000	E. camaldulensis
VT04	E. urophylla x E. grandis
AEC1528	Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla
I144	Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla
GG100	E. urophylla
CNB016	E. grandis (híbrido espontâneo)

As mudas, previamente cultivadas em tubetes, foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 21 L contendo solo e areia na proporção 1:1 e superfosfato simples foi misturado ao substrato para prover 200 mg/dm³ de P.

Após a transferência das mudas para o solo, foi aplicada a adubação de cobertura consistindo de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK 20-00-20, 361mg/L de solo) e micronutrientes (ácido bórico-1 mg/L, cloreto de cobre- 1,33 mg/L e sulfato de zinco-4 mg/L), baseados na análise de solo. Os reagentes foram diluídos em água e aplicados sobre a superfície do solo dos vasos. Essa adubação de cobertura foi aplicada a cada 30 dias (NPK) e 20 dias (micronutrientes), respectivamente. Após o preparo do solo e transplântio das mudas para os vasos, as mesmas foram aclimatadas, com a umidade do solo próxima à 100% da capacidade de campo (CC) por aproximadamente 30 dias.

Uma vez aclimatadas, as plantas foram submetidas à seca moderada de forma gradual até a umidade do solo atingir 65% da CC (percentual que promoveu a deficiência hídrica sem levar a morte das plantas), permanecendo sob essa condição por aproximadamente 30 dias. Para tanto, uma curva de calibração para controle diário da umidade do solo foi obtida. A umidade do solo foi aferida com um sensor e amostras foram coletadas para análise de umidade em laboratório, e baseado nesses valores, gerou-se uma regressão e a equação obtida foi utilizada para o ajuste de irrigação. O cálculo da CC foi realizado em vasos previamente irrigados e após drenagem (em casa de vegetação), por aproximadamente uma hora, a umidade foi aferida com o sensor e o valor obtido utilizado na curva de calibração.

Ao final do período de estresse, amostras foliares foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em freezer -80 °C para análises posteriores. Também foram coletadas amostras para a determinação da densidade estomática, detalhadas a seguir.

2.2- Avaliações biométricas e quantificação de biomassa

Ao longo do experimento, com auxílio de fita métrica, a altura das plantas foi mensurada. Ao final do experimento, as plantas foram divididas em folhas, caules, ramos e raiz para determinação da biomassa. Para tanto, os mesmos foram acondicionados em sacos de papel e mantidos em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até obtenção de massa constante.

2.3- Avaliações termográficas

Com o intuito de visualizar o contraste entre os tratamentos, bem como inferir sobre a temperatura foliar das plantas em resposta a imposição do déficit, plantas submetidas à SM, bem como as plantas controles (CC), foram colocadas lado a lado e, então fotografadas com câmera no infravermelho (FLIR systems T360, Nashua, USA).

2.4- Determinação da área foliar específica

Aproximadamente 15 folhas completamente expandidas do terço médio foram coletadas e digitalizadas em scanner (hp ScanJet 200). Em seguida, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. A área foliar específica foi determinada pela razão entre a área foliar (cm²) e a massa seca (g).

2.5- Determinação de pigmentos, açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido e proteínas solúveis totais

Amostras previamente coletadas, como descrito, acima (item 2.1) foram liofilizadas, alíquotadas e submetidas a extração metanólica à quente segundo Lisec et al., (2006), exceto pela adição do padrão ribitol. A determinação de pigmentos (clorofilas a e b) foi realizada como descrito por Wellburn (1994). O conteúdo de proteínas solúveis totais e de aminoácidos totais foram determinados conforme previamente descrito por Bradford (1976) e Yem et al., (1955), respectivamente. Os teores de amido e açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram determinados segundo Fernie et al., (2001).

2.6- Densidade estomática

Para avaliação da densidade estomática em folhas desenvolvidas durante o período de seca realizou-se a impressão de epiderme. De modo simplificado, essa técnica consiste em se colocar uma gota de espalhante adesivo (cola do tipo Super Bonder), sobre uma lâmina de vidro e, posteriormente, pressionar a região central da folha sobre a lâmina, por aproximadamente 10 segundos. Após esse período, retirou-se o fragmento foliar restando apenas a cola com a impressão da epiderme. Em seguida, o material foi levado ao microscópio com câmera acoplada, fotografado e, a

partir das imagens obtidas, o número de estômatos foi contabilizado (nº de estômatos/área).

2.7- Variáveis anatômicas

Folhas desenvolvidas durante o período de seca foram coletadas e previamente fixadas em Formaldeído, ácido acético e etanol 50% (FAA 50%) por 48 horas e armazenadas em etanol 70%. As mesmas foram subamostradas retirando-se um fragmento na região que contém a nervura principal das folhas. Esse material foi incluído em metacrilato e, após a polimerização, foram realizados cortes de 5 mm de espessura e corados, a posteriori, com azul de toluidina. Avaliou-se a espessura das epidermes inferior e superior, espessura do mesofilo, espessura total da folha e proporção de espaço intercelular. O pecíolo foi também coletado para obtenção de cortes anatômicos e, assim, o número, diâmetro e área do de vasos xilema foram determinados.

2.8- Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para a avaliação das premissas de normalidade dos resíduos aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R. Para a avaliação do teor de sacarose, foi utilizado o teste t (Student) no Excel.

2.9- Análise de componentes principais (PCA)

Os dados foram normalizados utilizando logaritmo na base 2 (\log_2), e em seguida, submetidos às análises utilizando o software MiniTab.

3- RESULTADOS

3.1- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono

A altura das plantas, obtida ao final do experimento, não foi afetada pela interação dos fatores clone e teor de umidade do solo, entretanto, houve diferença entre os materiais genéticos em condições controle (CC) ou de seca moderada (SM) (Figuras 1A e 2). Sob CC, os clones **CO1275**, **CO1277** e **CNB016** apresentaram incrementos na altura quando comparados aos demais materiais. No entanto, sob SM, os clones considerados tolerantes **VM01**, **CO1275**, **CO1445**, **CO1277**, **AEC2197**, **AEC3000** e os clones ditos sensíveis **AEC1528** e **CNB016** foram os que apresentaram maiores alturas.

A SM não promoveu alterações na área foliar específica (AFE) dos clones quando comparados à condição CC (Figura 1B). No entanto, sob CC ou sob SM, os clones sensíveis (**VT04**, **I144**, **GG100** e **CNB016**) apresentaram maior AFE, enquanto que os clones **CO1275**, **CO1445** e **AEC3000**, considerados tolerantes, apresentaram menor AFE.

A alocação de biomassa diferiu entre os materiais tolerantes e sensíveis (Figura 1C-F). Os clones **CO1275**, **CO1445**, **CO1277**, **AEC2034**, **AEC3000**, **VT04**, **AEC1528**, **I144**, **GG100** e **CNB016** em condições de SM apresentaram reduções na massa seca foliar quando comparados aos CC. Na CC os clones **AEC2034**, **VT04**, **I144** e **GG100** apresentaram maior biomassa foliar, enquanto que sob SM os clones que apresentaram maior massa seca foliar foram **VM01**, **CO1445**, **CO1277**, **AEC2197**, **AEC3000**, **VT04**, **AEC1528**, **I144** e **GG100** (Figura 1C).

A massa seca dos ramos foi influenciada pela interação dos fatores em estudo. Nesse sentido, reduções na massa seca dos ramos foram observadas nos clones **CO1275**, **CO1277**, **AEC2034**, **VT04**, **I144**, **GG100** e **CNB016** sob SM quando comparados à CC. Em plantas sob CC, o clone **VT04** apresentou maior massa seca dos ramos, o que não foi verificado para o clone **CO1445**. Os demais clones apresentaram valores intermediários com pequenas variações entre si. Sob SM, os clones **VM01**, **I144** e **GG100** apresentaram maior biomassa de ramos (Figura 1D).

Ao analisar a biomassa de caule, verificou-se que os clones **VM01**, **CO1275**, **AEC2034**, **AEC1528**, **I144** e **CNB016** apresentaram maiores valores em CC. Sob SM, o clone **VM01** foi o único que exibiu maior biomassa do caule (Figura 1E). Assim como

a massa seca de caule, a massa seca radicular não foi afetada pela interação dos fatores. Em CC, os clones VM01, CO1277, AEC2034, VT04, AEC1528, I144 e GG100 apresentaram maiores biomassa radicular. Ao comparar os clones submetidos à SM nota-se, também, que os clones VM01, AEC2034, AEC1528, I144 e GG100 apresentaram maior massa de raiz (Figura 1F).

Ao analisar, de maneira conjunta, as massas dos órgãos aéreos, observou-se que a mesma foi menor nos clones CO1275, CO1277, AEC2034, VT04, AEC1528, I144, GG100 e CNB016 sob SM em comparação às CC (Figura 1G). Em CC, os clones VM01, AEC2034, VT04, AEC1528, I144, GG100 e CNB016 apresentaram maiores valores de massa seca da parte aérea e, em SM, esse comportamento foi observado nos clones VM01, AEC2197, VT04, AEC1528, I144 e GG100 (Figura 1G).

Sob limitação hídrica, espera-se que as plantas invistam no sistema radicular em detrimento da parte aérea. Nesse sentido, não se observou interação dos fatores estudados (teor de umidade do solo), indicando que, nas condições ora utilizadas, a SM não promoveu alteração na alocação de carbono nesses materiais (Figura 1H).

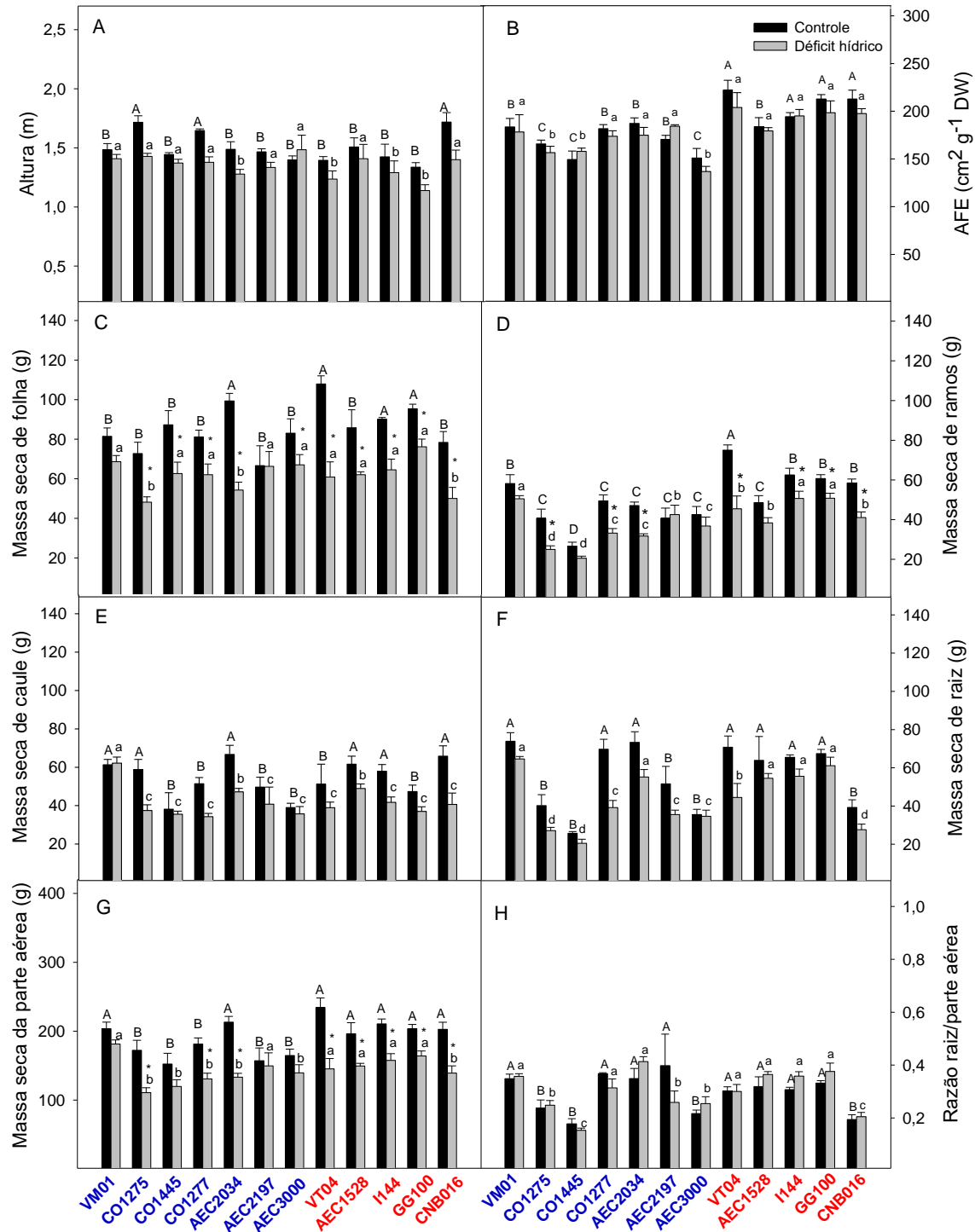


Figura 1- Características de crescimento de 12 clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-contrôle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: altura (A), área foliar específica (B), massa seca de folhas (C), massa seca de ramos (D), massa seca de caule (E), massa seca de raiz (F), massa seca da parte aérea (G) e razão raiz/parte aérea (H). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

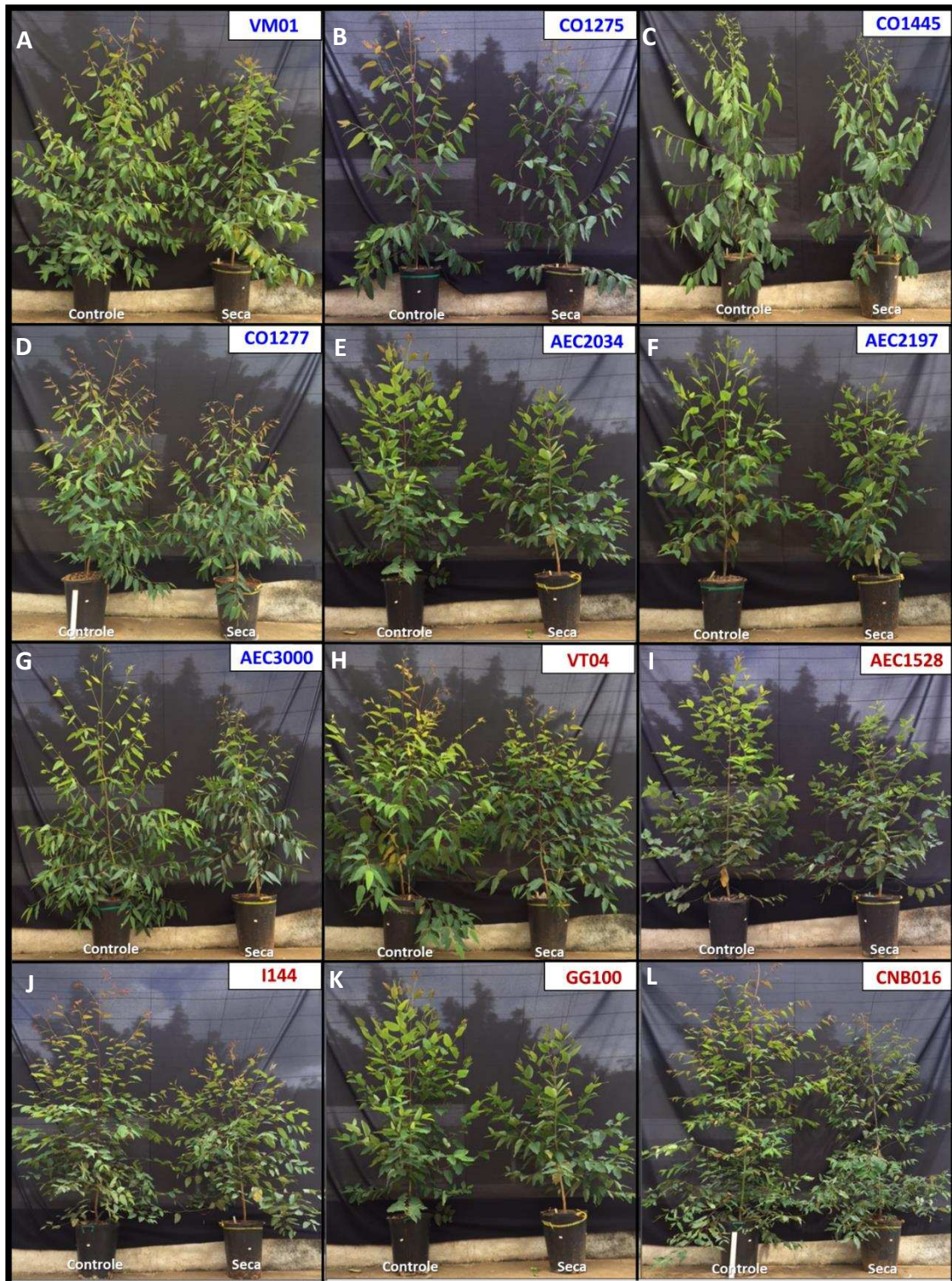


Figura 2- Visual de plantas de eucalipto submetidas a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Plantas em CC (esquerda) e SM (direita) ao final do ciclo de estresse (30 dias de déficit hídrico). Clones em azul são considerados tolerantes e em vermelho clones sensíveis.

Os dados biométricos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), onde verificou-se que os dois primeiros componentes, PC1 e PC2, representam 75,6% da variância total dos dados (Figura 3). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X, PC1 (61,7%), e teve a biomassa da parte aérea e de planta inteira como as variáveis que mais contribuíram, ao passo que a altura foi a variável com maior contribuição para o PC2 (13,9%). De acordo com a contribuição das variáveis, foi notada a formação de 7 grupos distintos. Assim, pode-se observar que os clones **VM01_C**, **VM01_S**, **CO1277_C**, **I144_C**, **AEC1528_C** e **CNB016_C** apresentaram estratégias semelhantes (grupo 1-verde). Os clones **AEC2034_S**, **AEC2197_S**, **AEC3000_S**, **CO1445_S**, **CO1445_C** e **CNB016_S** formaram um segundo grupo (amarelo escuro). O terceiro grupo é composto pelos clones **CO1277_S**, **AEC2197_C**, **GG100_S**, **I144_S** e **AEC1528_S** (laranja). Os clones **CO1275_S** e **VT04_S** formaram o quarto grupo (amarelo claro). Já o grupo 5 foram formados pelos clones **AEC3000** e **VT04**, ambos sob CC (vermelho). O sexto grupo é formado pelos clones **AEC2034_C** e **GG100_C** (azul), enquanto que o sétimo grupo é formado apenas pelo clone **CO1275_C** (cinza).

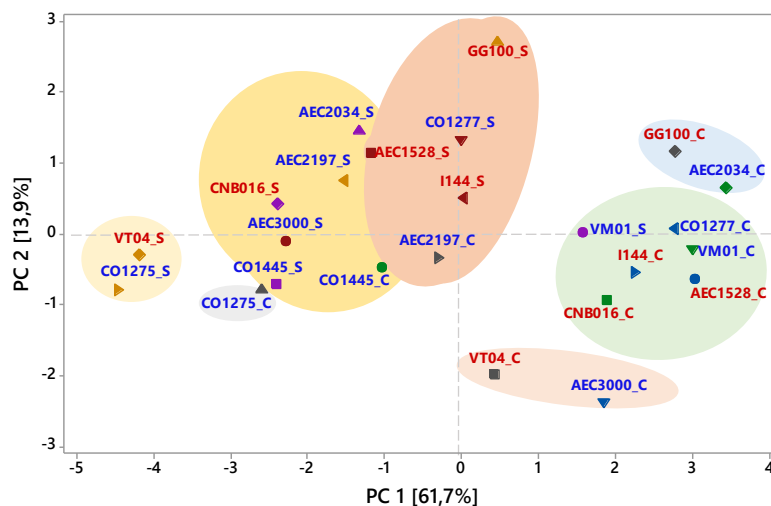


Figura 3- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados biométricos de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob CC (C) e SM (S). Detalhes adicionais sobre cultivo podem ser verificados na Figura 1. De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 7 grupos distintos. Grupo 1-verde: (**VM01_C**, **VM01_S**, **CO1277_C**, **I144_C**, **AEC1528_C** e **CNB016_C**); Grupo 2-amarelo escuro: (**AEC2034_S**, **AEC2197_S**, **AEC3000_S**, **CO1445_S**, **CO1445_C** e **CNB016_S**); Grupo 3-laranja: (**CO1277_S**, **AEC2197_C**, **GG100_S**, **I144_S** e **AEC1528_S**); Grupo 4-amarelo claro: (**CO1275_S** e **VT04_S**); Grupo 5-vermelho: (**AEC3000_C** e **VT04_C**); Grupo 6-azul: (**AEC2034_C** e **GG100_C**); e Grupo 7-cinza: (**CO1275_C**)

3.2- Avaliações termográficas

De modo geral, sob condições de limitada disponibilidade hídrica (SM), clones tolerantes apresentaram temperatura foliar mais fria (cores azuis), semelhante a plantas sob CC como verificado nos clones **VM01** e **AEC3000** (Figura 4A-B). Em adição, clones sensíveis ao déficit hídrico, como o clone **CNB016**, apresentaram maiores temperaturas foliar em relação ao controle (Figura 4L).

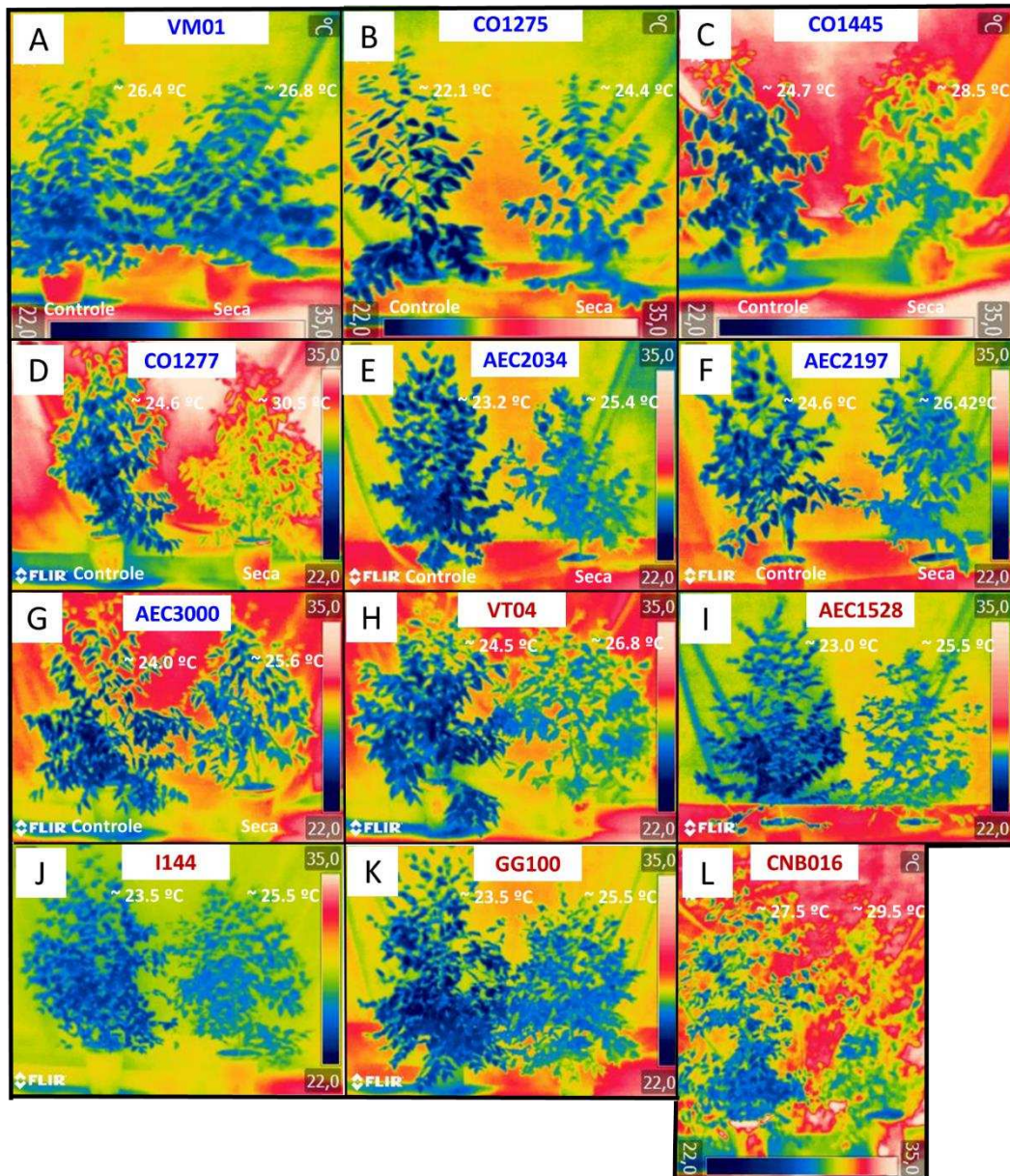


Figura 4- Características termográficas de 12 clones de eucalipto submetidas a duas condições de condições umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e seca moderada – 65% CC (SM)]. Fotos termográficas comparando clones tolerantes (clones em azul) e sensíveis (clones em vermelho) sob CC e SM.

3.3- Mudanças metabólicas em resposta à disponibilidade hídrica

Com o intuito de verificar as alterações desencadeadas pela SM, metabólitos importantes foram quantificados. Primeiramente, observou-se que a razão clorofila a/b e clorofilas totais não foram afetadas pela interação dos fatores clone e teor de umidade do solo, apresentando apenas efeito clonal, com impacto fisiológico pouco pronunciado (Figuras 5A-B).

Os teores de aminoácidos totais aumentaram para os clones [CO1275](#), [CO1445](#), [AEC2034](#), [AEC2197](#), [AEC3000](#), [AEC1528](#) e [CNB016](#) sob condições de SM em relação à CC. Já sob condições de SM, apenas os clones [AEC2034](#) e [CNB016](#) apresentaram incrementos de teor (Figura 5C). A prolina, aminoácido conhecido por ter sua síntese aumentada em resposta a condições de estresse, como deficiência hídrica, apresentou incrementos no clone [AEC2197](#) e reduções nos clones [VT04](#) e [AEC1528](#). Em CC, o clone [VM01](#) apresentou maior teor de prolina (Figura 5D). As proteínas solúveis totais, assim como os aminoácidos, também foram sensíveis aos teores e umidade do solo e material genético. Os clones [VM01](#), [AEC3000](#), [VT04](#) e [CNB016](#) apresentaram incrementos de proteínas sob SM quando comparados à CC. O clone [CO1445](#) exibiu maiores teores de proteína em CC. Sob SM, o clone [CNB016](#) apresentou o mesmo comportamento (Figura 5E).

Incrementos nos teores de glicose foram observados nos clones [VM01](#), [CO1275](#), [CO1445](#), [CO1277](#), [AEC2034](#), [AEC2197](#), [AEC1528](#) e [CNB016](#) quando submetidos à SM em comparação à CC. Em plantas irrigadas, os clones [CO1275](#), [VT04](#), [I144](#) e [GG100](#) apresentaram maiores teores de glicose. Cabe mencionar, também, que, sob SM, o clone [AEC2034](#) apresentou o maior teor de glicose, enquanto que o clone [AEC3000](#) teve o menor (Figura 6A). Diferentemente da glicose, o conteúdo de frutose exibiu interação dos fatores entre CC e SM e aumentou na maioria dos clones sob SM, exceto para os clones [AEC3000](#) e [GG100](#). Em CC, apenas os clones [VT04](#) e [I144](#) sobressaíram em relação aos demais, assim como ocorreu para glicose, seguidos por [CO1445](#) e [GG100](#), enquanto os demais clones apresentaram os menores valores e não diferiram entre si. Similarmente ao ocorrido para glicose, sob SM maiores incrementos nos teores de frutose foram observados apenas para o clone [AEC2034](#), enquanto que o clone [AEC3000](#) apresentou os menores (Figura 6B).

Os teores de sacarose não apresentaram interação dos fatores entre umidade do solo (CC e SM) e clones, apesar de haver tendência de aumentos para os clones

sob condição de seca. O teste t de Student foi então realizado para verificar essas diferenças entre clones x teor de umidade do solo e notamos que todos os clones sob SM apresentaram incrementos em sacarose. Os clones **VM01**, **CO1277**, **VT04** e **I144** apresentaram maiores valores sob condições controle. Entretanto, sob SM o clone **VM01** foi o único que apresentou maior teor de sacarose em relação aos demais, estes que não diferiram entre si (Figura 6C). O amido não diferiu em clones submetidos à SM em comparação à C). Em CC, apenas o clone **CNB016** apresentou maior acúmulo de amido. Já sob SM, destaca-se maior acúmulo nos clones **VM01**, **CO1445**, **GG100** e **CNB016** (Figura 6D).

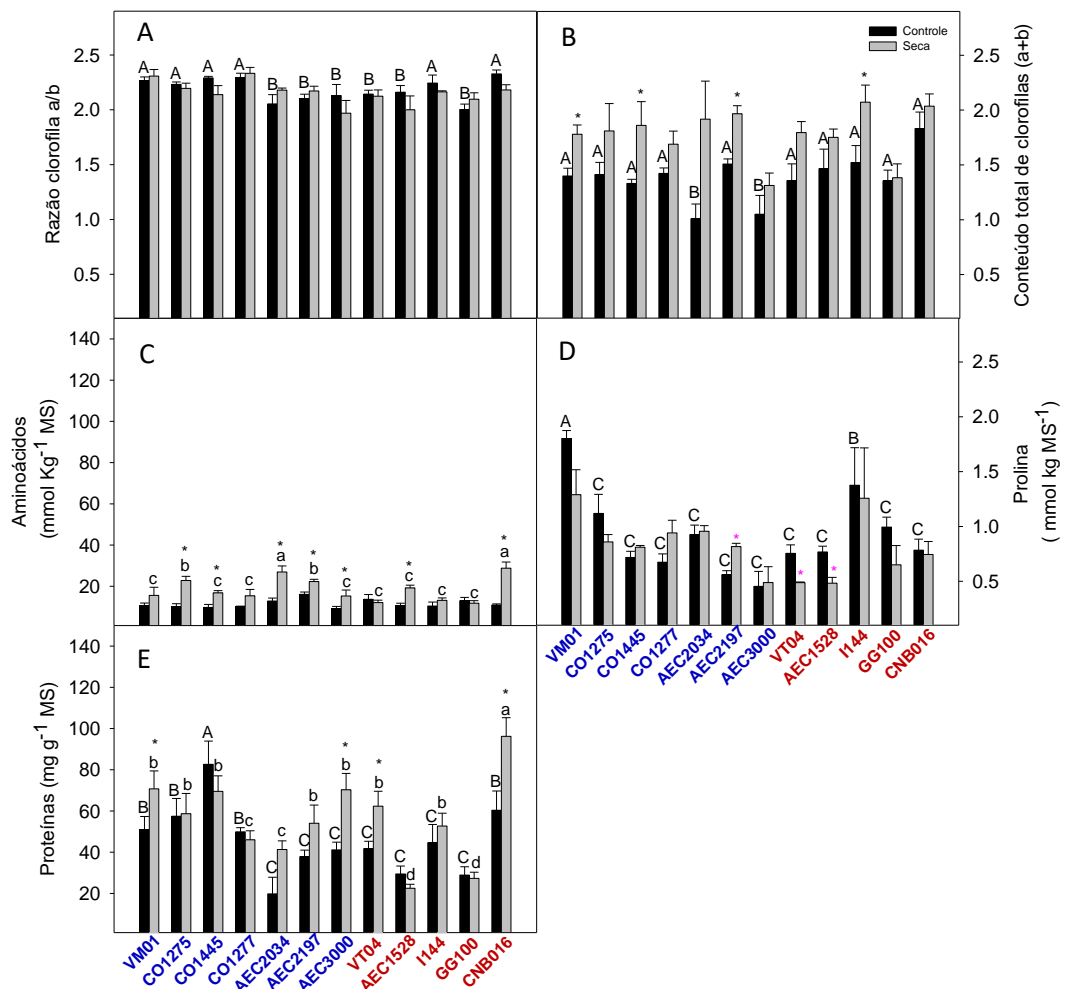


Figura 5- Teores de compostos orgânicos e de clorofilas em folhas de clones de eucalipto submetidos a duas condições de condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-control) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: razão clorofila a/b (A), conteúdo total de clorofila (a+b) (B), aminoácidos totais (C), prolina (D) e proteínas solúveis totais (E). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM (de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$)). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 3 repetições biológicas.

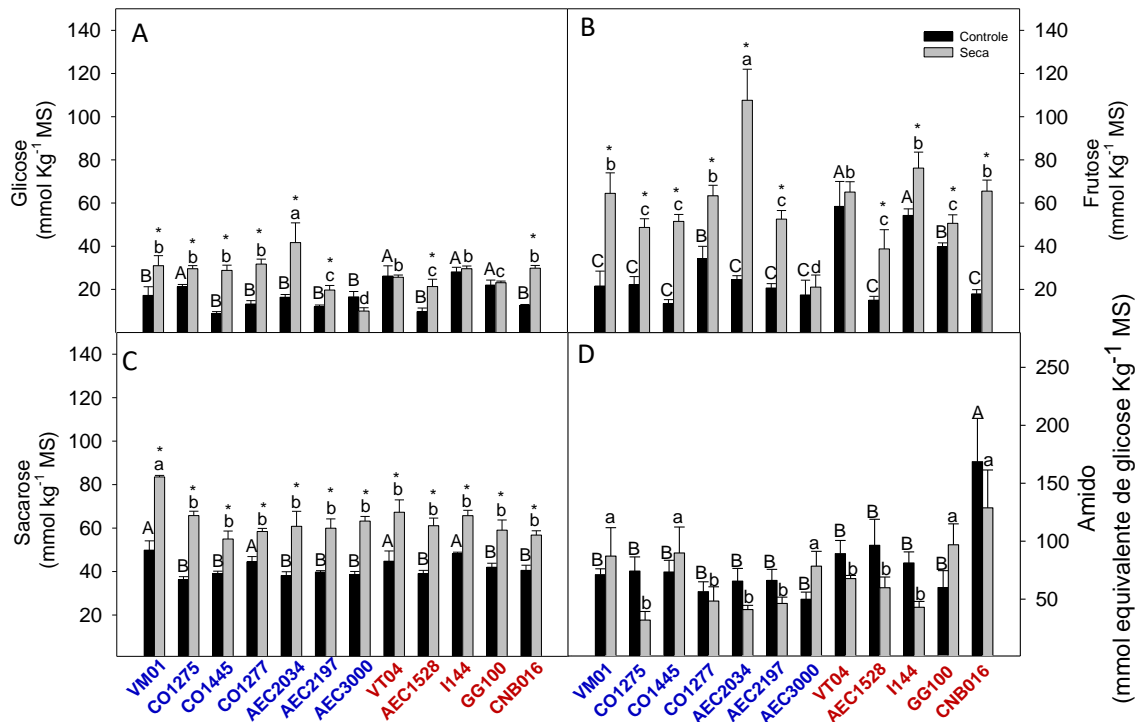


Figura 6- Teores de açúcares e amido em folhas de clones de eucalipto submetidos a duas condições de condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-contrôle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 3 repetições biológicas.

Os resultados das variáveis metabólicas foram também submetidos à análise de componentes principais (PCA), e notou-se que os dois primeiros componentes representam 71,4% da variância total dos dados (Figura 7). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X, PC1 (52,2%), e teve frutose e sacarose como as variáveis que mais contribuíram para o PC1, ao passo que proteínas e amido contribuíram para o PC2 (19,2%). De acordo com a contribuição das variáveis, observou-se a formação de 8 grupos específicos, sendo eles: grupo 1 - amarelo claro (CO1277_S, CO1275_S, AEC2034_S, AEC2197_S e I144_S), grupo 2 – verde (CO1445_S, VM01_S e VT04_S), grupo 3 – vermelho (AEC2034_C, GG100_C e AEC1528_S), grupo 4 – amarelo escuro (AEC3000_C, AEC2197_C e AEC1528_C), grupo 5 – azul (CO1445_C, AEC3000_S e CNB016_C), grupo 6 – laranja (GG100_S, VT04_C e I144_C), grupo 7 – cinza claro (CO1277_C, CO1275_C e VM01_C) e grupo 8 – cinza escuro (CNB016_S).

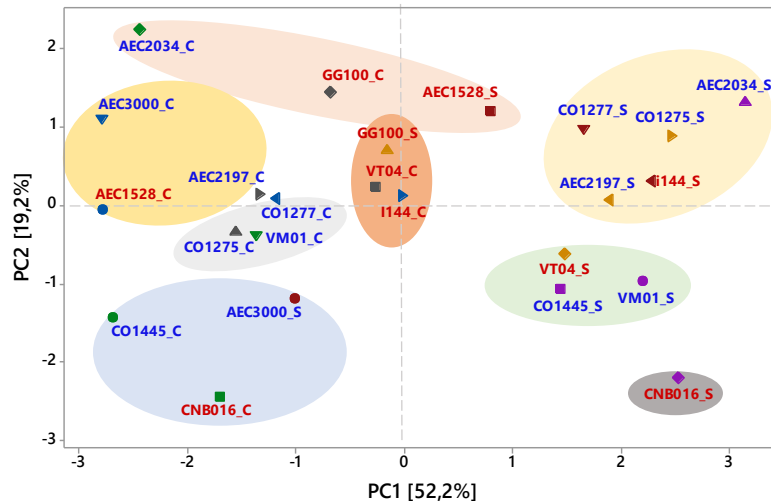


Figura 7- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados de variáveis metabólicas de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob CC (C) e SM (S). De acordo com a contribuição das variáveis, observou-se a formação de 8 grupos, sendo eles: Grupo 1-amarelo claro: (CO1277_S, CO1275_S, AEC2034_S, AEC2197_S e I144_S); Grupo 2-verde: (CO1445_S, VM01_S e VT04_S); Grupo 3-vermelho: (AEC2034_C, GG100_C e AEC1528_S); Grupo 4-amarelo escuro: (AEC3000_C, AEC2197_C e AEC1528_C); Grupo 5-azul: (CO1445_C, AEC3000_S e CNB016_C); Grupo 6-laranja: (GG100_S, VT04_C e I144_C); Grupo 7-cinza claro: (CO1277_C, CO1275_C e VM01_C); e Grupo 8-cinza escuro: (CNB016_S).

3.4- Impactos anatômicos em folhas sob déficit hídrico

A densidade estomática (nº de estômatos/área) foi mensurada tanto na face inferior (abaxial) quanto na face superior (adaxial), possibilitando também o seu somatório. Não houve interação dos fatores genótipo e ambiente para essas variáveis (Tabela 1). Sob CC, os clones VM01, CO1277, AEC2034, AEC2197, AEC1528, I144, GG100 e CNB016 apresentaram maior densidade estomática na face abaxial em relação aos demais. Maiores densidades estomáticas na face abaxial em condições de SM foram observadas apenas no clone AEC1528, ao passo que nos clones CO1275, CO1445 e AEC3000 reduções mais pronunciadas em relação aos demais clones foram notadas. Registre-se, também, que somente clones ditos tolerantes apresentaram estômatos na face adaxial (Tabela 1; Figura 8). Dentre os clones tolerantes, o clone CO1445 é o que apresenta maior densidade estomática em ambas as condições, CC e SM. Em adição, o somatório do número de estômatos por unidade de área nas duas faces foliares, em plantas sob CC, foi maior nos clones VM01, CO1445, CO1277, AEC2197, AEC3000, AEC1528, I144 e CNB016 (Tabela 1). Já em plantas submetidas à SM, os clones VM01, CO1445, CO1277, AEC1528 e I144 apresentaram maior densidade estomática.

Tabela 1- Densidade estomática em 12 clones de eucalipto submetidos a duas condições de condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

		Densidade estomática (nº de estômatos/área)		
		Face abaxial	Face adaxial	Face abaxial e adaxial
VM01	Controle	454,93 \pm 19,18 A	95,53 \pm 13,12 C	550,47 \pm 28,16 A
	Seca	451,73 \pm 36,67 c	106,93 \pm 22,03 c	558,67 \pm 44,95 a
CO1275	Controle	332,87 \pm 37,41 B	87,13 \pm 5,58 C	420,00 \pm 37,17 B
	Seca	332,60 \pm 20,00 d	92,67 \pm 9,08 c	425,27 \pm 24,62 c
CO1445	Controle	319,60 \pm 31,93 B	225,93 \pm 21,51 A	545,53 \pm 52,49 A
	Seca	358,80 \pm 36,89 d	284,07 \pm 20,09 a	642,87 \pm 51,56 a
CO1277	Controle	422,60 \pm 6,62 A	143,67 \pm 8,39 B	566,27 \pm 7,72 A
	Seca	457,40 \pm 25,90 c	177,27 \pm 12,53 b	634,67 \pm 30,29 a
AEC2034	Controle	423,80 \pm 17,19 A	7,93 \pm 0,97 D	431,73 \pm 17,51 B
	Seca	441,00 \pm 33,61 c	6,93 \pm 1,33 d	447,93 \pm 34,59 c
AEC2197	Controle	508,07 \pm 16,18 A	6,47 \pm 2,50 D	514,53 \pm 18,61 A
	Seca	492,13 \pm 13,95 b	17,67 \pm 3,98 d *	509,80 \pm 12,46 b
AEC3000	Controle	378,67 \pm 9,97 B	170,40 \pm 12,60 B	549,07 \pm 28,53 A
	Seca	355,40 \pm 30,30 d	168,60 \pm 13,29 b	524,00 \pm 33,60 b
VT04	Controle	301,92 \pm 62,84 B	ND	301,92 \pm 62,84 C
	Seca	402,75 \pm 75,82 c	ND	402,75 \pm 75,82 c
AEC1528	Controle	487,13 \pm 41,31 A	ND	487,13 \pm 41,31 A
	Seca	632,53 \pm 33,16 a *	ND	632,53 \pm 33,16 a *
I144	Controle	480,80 \pm 66,01 A	ND	480,80 \pm 66,01 A
	Seca	549,67 \pm 19,31 b	ND	549,67 \pm 19,31 a
GG100	Controle	415,40 \pm 51,48 A	ND	415,40 \pm 51,48 B
	Seca	506,87 \pm 33,56 b	ND	506,87 \pm 33,56 b
CNB016	Controle	495,83 \pm 38,71 A	ND	495,83 \pm 38,71 A
	Seca	520,07 \pm 11,90 b	ND	520,07 \pm 11,90 b

A espessura dos tecidos (epiderme superior e inferior, mesofilo e espessura total) apresentaram poucas diferenças entre CC e SM, destacando-se: redução da epiderme superior no clone **CO1275**, aumento da espessura da epiderme inferior no clone **AEC2197**, redução da espessura do mesofilo no clone **AEC3000** e da espessura total no clone **CO1445** em plantas sob SM em comparação à CC (Tabela 2). Com efeito, os clones **VT04**, **I144**, **GG100**, e **CNB016**, sob CC, apresentaram menor espessura foliar total, ao passo que os clones **CO1277**, **AEC2034** e **AEC3000** nas

mesmas condições exibiram maiores espessuras. Ao se analisar todos os clones sob SM, os clones **CO1275**, **AEC2034**, **AEC2197**, **AEC3000**, **AEC1528**, **I144** e **CNB016** apresentaram maior espessura total em relação aos demais.

Tabela 2- Espessura dos tecidos em 12 clones de eucalipto submetidos e duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

		Espessura dos tecidos (mm)			
		Epiderme superior	Epiderme inferior	Mesofilo	Total
VM01	Controle	12,29 \pm 0,43 C	10,93 \pm 0,15 B	164,70 \pm 6,13 B	187,14 \pm 6,58 B
	Seca	11,54 \pm 0,38 b	10,30 \pm 0,36 b	160,74 \pm 3,40 b	181,62 \pm 3,76 b
CO1275	Controle	12,40 \pm 0,33 C *	10,79 \pm 0,36 B	174,18 \pm 5,45 A	197,76 \pm 5,49 B
	Seca	10,93 \pm 0,42 c	10,46 \pm 0,72 b	174,67 \pm 4,28 a	197,28 \pm 4,06 a
CO1445	Controle	10,32 \pm 0,32 D	10,06 \pm 0,22 C	175,36 \pm 7,20 A	196,06 \pm 7,35 B
	Seca	10,14 \pm 0,24 c	9,19 \pm 0,32 c	157,26 \pm 3,92 b	176,04 \pm 4,15 b *
CO1277	Controle	11,07 \pm 0,69 D	9,63 \pm 0,22 C	189,29 \pm 6,97 A	210,04 \pm 7,69 A
	Seca	12,12 \pm 0,17 b	9,88 \pm 0,31 c	177,76 \pm 1,92 a	199,16 \pm 1,70 a
AEC2034	Controle	15,99 \pm 0,23 A	12,96 \pm 0,65 A	191,71 \pm 8,83 A	219,25 \pm 9,44 A
	Seca	15,20 \pm 0,51 a	12,73 \pm 0,34 a	177,56 \pm 6,70 a	203,08 \pm 6,25 a
AEC2197	Controle	13,21 \pm 0,64 B	11,07 \pm 0,26 B	178,42 \pm 9,73 A	202,06 \pm 9,91 B
	Seca	13,92 \pm 0,48 a	12,52 \pm 0,49 a *	165,56 \pm 4,04 a	190,11 \pm 4,41 a
AEC3000	Controle	12,89 \pm 0,58 C	11,07 \pm 0,67 B	183,26 \pm 3,38 A	206,19 \pm 3,50 A
	Seca	12,99 \pm 0,62 b	11,22 \pm 0,35 b	167,87 \pm 5,49 a *	190,98 \pm 6,24 a
VT04	Controle	12,31 \pm 0,63 C	10,08 \pm 0,40 C	143,49 \pm 2,87 B	164,30 \pm 2,86 C
	Seca	12,99 \pm 0,42 b	10,63 \pm 0,70 c	153,75 \pm 8,33 b	176,89 \pm 9,57 c
AEC1528	Controle	14,12 \pm 0,73 B	11,32 \pm 0,30 B	172,89 \pm 5,63 A	197,77 \pm 6,63 B
	Seca	12,44 \pm 0,33 b	10,95 \pm 0,23 b	174,28 \pm 2,40 a	196,76 \pm 3,17 a
I144	Controle	11,91 \pm 0,42 C	9,88 \pm 0,41 C	152,59 \pm 4,06 B	173,20 \pm 4,11 C
	Seca	12,41 \pm 0,45 b	10,42 \pm 0,32 b	166,68 \pm 6,07 a	188,99 \pm 6,53 a
GG100	Controle	14,32 \pm 0,77 B	10,53 \pm 0,83 C	143,36 \pm 6,57 B	165,43 \pm 7,42 C
	Seca	14,68 \pm 0,66 a	10,79 \pm 0,34 b	159,24 \pm 10,48 b	183,94 \pm 11,36 b
CNB016	Controle	10,70 \pm 0,79 D	8,98 \pm 0,52 C	153,06 \pm 2,06 B	173,71 \pm 3,68 C
	Seca	11,95 \pm 0,47 b	9,40 \pm 0,44 c	166,29 \pm 10,39 a	186,70 \pm 11,10 a

Não houve interação dos fatores entre CC e SM em resposta à limitação hídrica no que se refere à porcentagem de espaço intercelular (Figura 8A). No entanto, é possível observar características intrínsecas aos materiais. Com efeito, os clones

CO1275, CO1445, CO1277, AEC2197 e AEC3000 apresentam menor porcentagem de espaço intercelular sob condições CC e SM (Figuras 8A e 9).

O número de vasos do xilema também é uma característica importante associada a tolerância à seca. Sob SM houve aumento do número de vasos do xilema nos clones VM01, CO1275, CO1277, AEC1528, GG100 e CNB016 (Figura 8B). Reduções no diâmetro médio e área média do xilema, que são importantes mudanças para evitar a ruptura dos condutos, foram observadas nos clones CO1275, AEC2034, AEC1528 e GG100 sob SM em comparação à CC. (Figuras 8C-D).

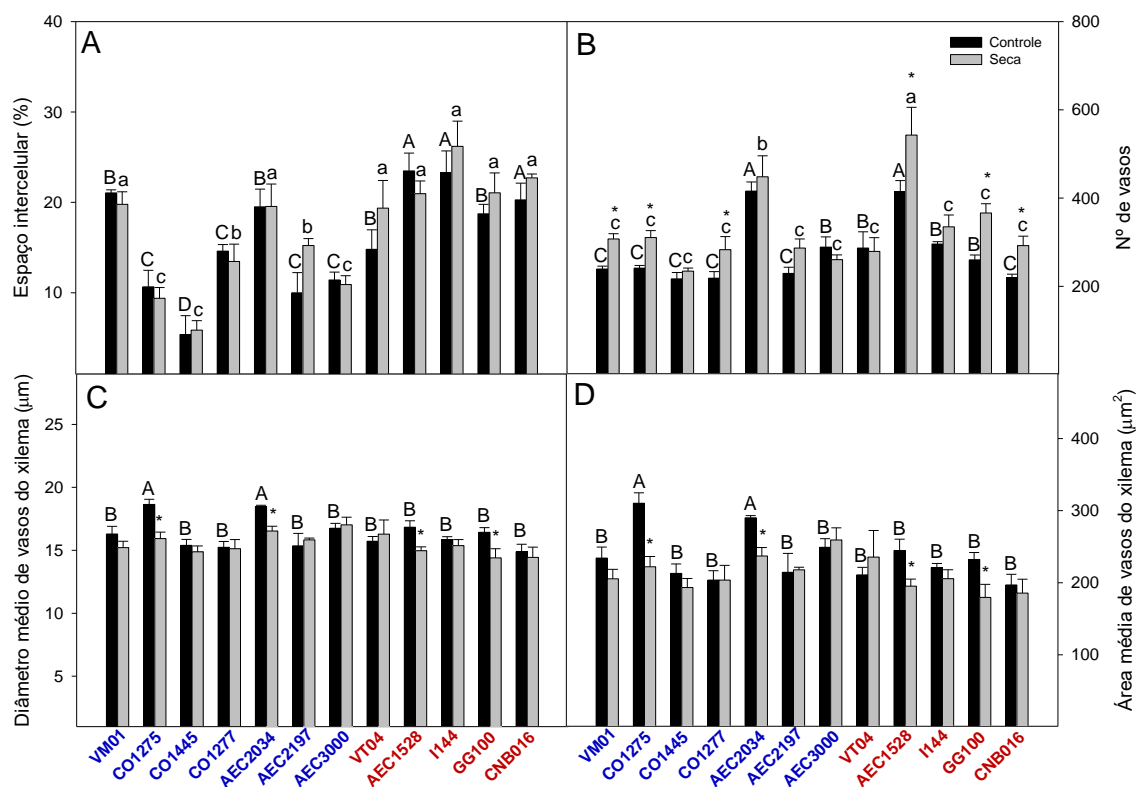


Figura 8- Características vasculares de 12 clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e seca moderada – 65% da capacidade de campo (SM)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: porcentagem de espaço intercelular (A), nº de vasos (B), diâmetro médio de vasos do xilema (C) e área média de vasos do xilema. Letras maiúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob condições CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 3 repetições biológicas.

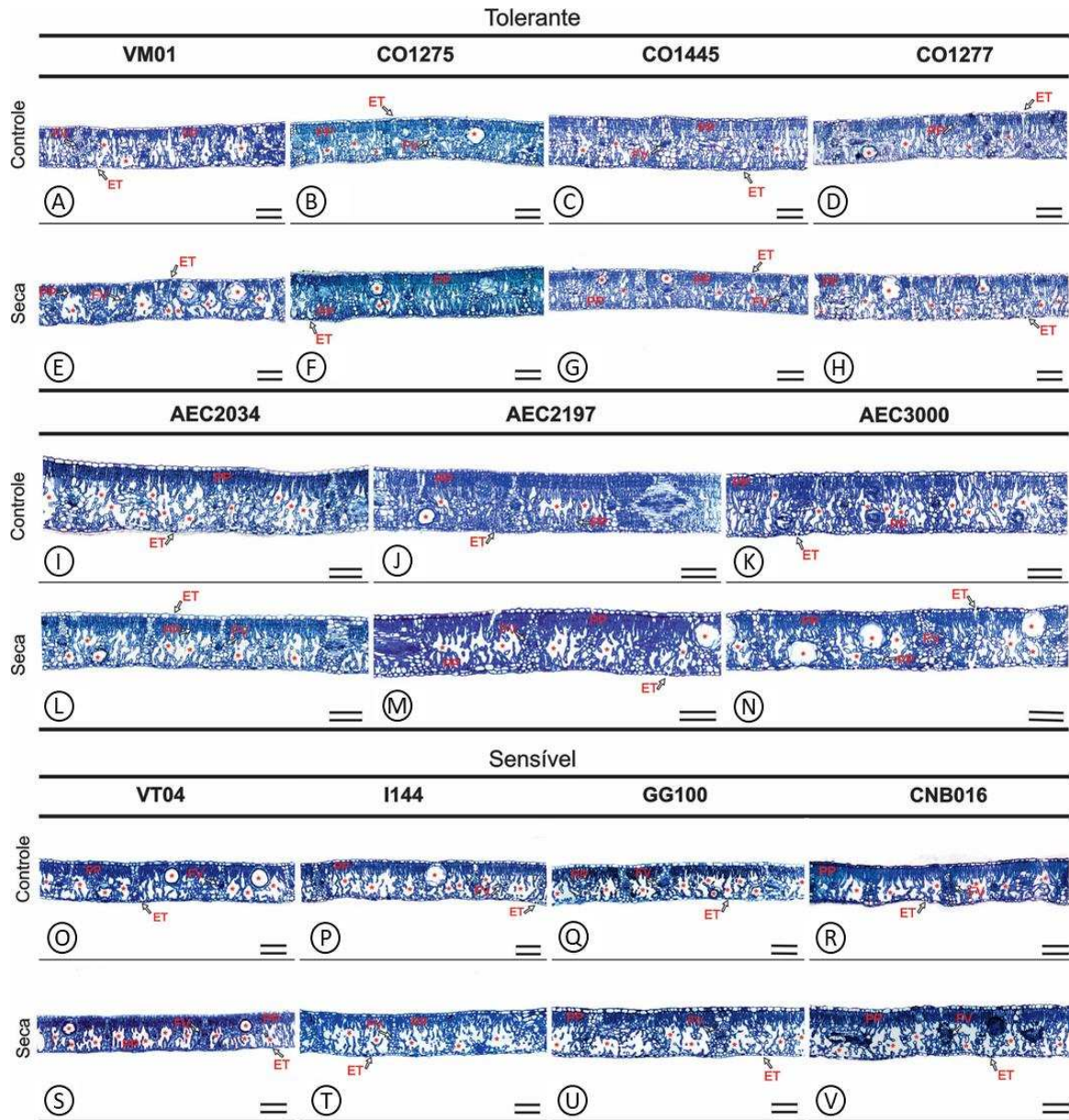


Figura 9- Anatomia foliar de clones de eucalipto tolerantes e sensíveis à seca. ET: estômato, PP: parênquima paliçádico, FV: feixe vascular e *: espaço intercelular. Escala equivale a 100 μ m.

Os resultados das variáveis anatômicas, submetidas à análise de componentes principais, culminaram com os dois primeiros componentes representando 71,1% da variância total dos dados (Figura 10). As variações em ambos os eixos foram bastante similares (PC1 37,9% e PC2 33,2%); não obstante, as variáveis espessura interna e total da folha foram as que mais contribuíram para PC1, enquanto que a espessura da epiderme superior e densidade estomática da face adaxial foram as variáveis que mais contribuíram para PC2. Dessa forma, observou-se a formação de 3 grupos. O grupo 1 (vermelho) é formado pelos clones [VM01_C](#), [VM01_S](#), [CO1275_C](#),

CO1275_S, CO1445_C, CO1445_S, CO1277_C, CO1277_S, AEC3000_C e AEC3000_S. O grupo 2 (azul) é composto pelos clones AEC1528_C, AEC1528_S, CNB016_C, CNB016_S, I144_C, I144_S, GG100_C, GG100_S, VT04_C e VT04_S. Já o grupo 3 (amarelo escuro) é formado pelos clones AEC 2197_C, AEC2197_S, AEC2034_C e AEC2034_S.

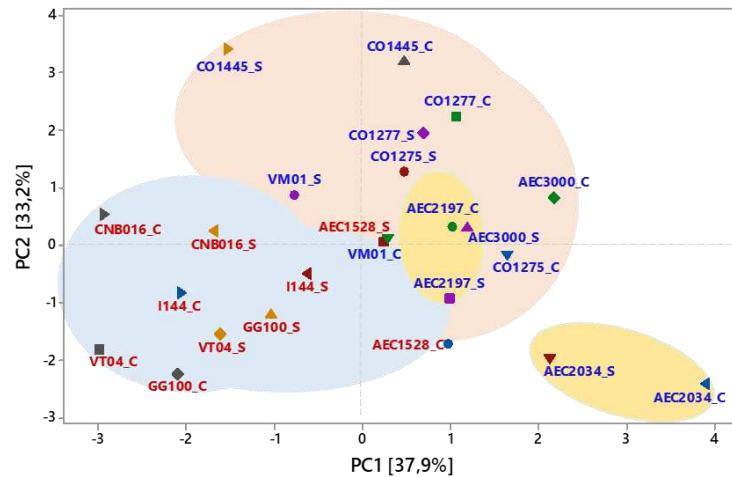


Figura 10- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados anatômicos de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob condições CC (C) e SM (S). Observou-se a formação de 3 grupos. Grupo 1-vermelho: (CO1445_S, VM01_S, CO1445_C, CO1277_C, CO1277_S, CO1275_S, VM01_C, CO1275_C, AEC3000_S e AEC3000_C); Grupo 2-azul: (AEC1528_C, AEC1528_S, CNB016_C, CNB016_S, I144_C, I144_S, GG100_C, GG100_S, VT04_C e VT04_S); e Grupo 3-amarelo escuro: (AEC 2197_C, AEC2197_S, AEC2034_C e AEC2034_S).

4- DISCUSSÃO

Embora a disponibilidade hídrica não tenha promovido interação dos tratamentos entre plantas controle (CC) versus plantas sob seca moderada (SM) para a maioria dos parâmetros biométricos, respostas diferenciais foram observadas em clones mantidos em condição hídrica adequada ou quando submetidas à restrição hídrica (Figura 1). Assim, foi possível identificar bioindicadores morfoanatômicos e fisiológicos capazes de explicar, mesmo que parcialmente, a tolerância diferencial à seca usualmente observada em clones comerciais de eucalipto.

A AFE, razão entre área e biomassa seca foliar, indica o investimento em biomassa por unidade de área (Poorter et al., 2009). Menores AFE indicam folhas mais grossas, com maior densidade celular, mais lignificadas e, ao mesmo tempo, redução da área foliar. Com efeito, todas essas características são importantes para

tolerância à seca em plantas. Não se notaram reduções significativas na AFE em plantas sob SM em relação à CC, sugerindo que esta seja, possivelmente, uma característica intrínseca dos genótipos. Ressalta-se que os genótipos mais tolerantes apresentam, em sua grande maioria, menor AFE sugerindo que este seja um parâmetro eficaz na predição da tolerância à seca. Esse mesmo efeito foi observado por Maseda & Fernández (2016) ao avaliarem seis plântulas de eucalipto em que a seca não promoveu alterações na AFE. Não obstante, Pita & Pardos (2001) verificaram reduções da AFE em plantas de eucalipto submetidos à seca. Registre-se, ainda, que, sob SM, os clones [CO1275](#), [CO1445](#) e [AEC3000](#) (clones tolerantes) apresentaram reduções na AFE, em comparação aos demais materiais, na mesma condição (Figura 1B).

A alocação de carbono nos diversos órgãos da planta é um fator importante na compreensão dos impactos da deficiência hídrica sobre o crescimento vegetal (Guo et al., 2015). Neste contexto, análises de crescimento e alocação da biomassa em resposta à limitação hídrica são eficazes em distinguir materiais mais produtivos dos menos produtivos. Cabe ressaltar que, particularmente no caso de eucalipto, clones menos produtivos nem sempre são os menos tolerantes à restrição hídrica. Em *Populus* esse efeito também foi bastante observado (Monclus et al., 2006). Durante a seca, a produtividade de um genótipo diminui devido à ocorrência de fechamento estomático. Tal estratégia de tolerância é de suma importância para evitar perdas excessivas de água em alguns genótipos, o que resultaria, em última instância, em menor assimilação de CO₂.

A massa seca da parte aérea foi menor para a maioria dos clones sob SM em relação à CC, exceto para os clones [VM01](#), [CO1445](#), [AEC2197](#) e [AEC3000](#) (Figura 1G). Esses clones estão presentes no grupo de materiais considerados tolerantes segundo o ranking fenotípico. Por outro lado, os clones [CO1275](#), [CO1277](#) e [AEC2034](#), apesar de considerados tolerantes, apresentaram reduções acentuadas na biomassa que, aparentemente, estariam relacionadas a um comportamento estomático mais conservador, de modo a evitar a perda excessiva de água. Cabe ressaltar também que todos os clones considerados sensíveis apresentaram reduções da biomassa. Em adição, ao se investigar duas populações de *Pinus tabuliformis*, oriundas de ambientes distintos, verificou-se que a seca impactou negativamente diversas

características entre elas a alocação de biomassa. Todavia, a população considerada de maior tolerância apresentou menor redução na biomassa (Ma et al., 2014).

Com o intuito de verificar os mecanismos de dissipação de energia em plantas sob seca, uma câmera com sensor térmico por infravermelho foi utilizada. Essa análise permite inferir a temperatura foliar através de uma escala variando entre superfícies frias (azuis) a quentes (vermelho). Neste contexto, é possível avaliar as relações hídricas, principalmente a regulação estomática, considerando que os estômatos estão diretamente envolvidos no processo de dissipação energética através da transpiração (Jones et al., 2009). Assim, o aumento das trocas gasosas estaria associado ao resfriamento da superfície foliar devido ao processo transpiratório (Biju et al., 2018). Aqui, clones tolerantes submetidos à SM (e.g. [VM01](#) e [AEC3000](#)), apresentaram temperatura foliar similares às CC, ou seja, apresentaram temperatura foliar mais fria (Figura 4). Já os clones considerados sensíveis, (e.g. [VT04](#) e [CNB016](#)), exibem temperatura foliar mais elevada sob SM em relação à CC (Figura 4). Assim, a menor variação na temperatura foliar dos clones tolerantes sob condições de SM em relação à CC indica uma maior capacidade de arrefecimento. Tomados em conjunto, a avaliação termográfica mostrou-se efetiva na seleção de genótipos de eucalipto tolerantes à seca, como previamente relatado num grupo de 37 genótipos de lentilha (Biju et al., 2018).

Outros mecanismos de proteção são utilizados pelas plantas sob déficit hídrico, como por exemplo, acúmulo de aminoácidos livres e açúcares, que auxiliam no ajustamento osmótico (Farooq et al., 2009). Proteínas podem também auxiliar na tolerância uma vez que muitas delas apresentam solubilidade em água (Farooq et al., 2009). No presente trabalho, observou-se acúmulo de aminoácidos solúveis totais em 5 clones tolerantes ([CO1275](#), [CO1445](#), [AEC2034](#), [AEC2197](#) E [AEC3000](#)) e 2 clones sensíveis ([AEC1528](#) e [CNB016](#)) (Figura 5C). Entretanto, os teores de proteínas foram maiores nos clones [VM01](#) e [AEC3000](#), considerados tolerantes, e nos clones sensíveis [VT04](#) e [CNB016](#) (Figura 5E). O aumento de aminoácidos solúveis totais sem alteração nos teores de proteínas para os clones [CO1275](#), [CO1445](#), [AEC2034](#), [AEC2197](#) e [AEC1528](#) sugere que não houve degradação de proteínas para sustentar o acúmulo de aminoácidos. Comportamento similar, acúmulo de aminoácidos sem alteração nos teores de proteínas, foi observado também em dois genótipos de umbu (*Spondias tuberosa*) sob seca (Silva et al., 2009). Vale destacar que processos de

síntese e degradação de proteínas estão associados a incorporação e liberação de aminoácidos (Lyon et al., 2016) e que, alguns tipos de aminoácidos, como os aminoácidos de cadeia ramificada, foram relatados como capazes de influenciar na tolerância à seca em *Arabidopsis thaliana* (Pires et al., 2016). Aumentos no conteúdo de aminoácidos de cadeia ramificada, em resposta à estresses como a seca, parece estar associado ao uso desses aminoácidos como substrato respiratório (Araújo et al., 2011).

Dentre os aminoácidos, a prolina pode apresentar função osmótica (Farooq et al., 2009) de suma importância em resposta a estresses vários. Neste contexto, o acúmulo de prolina, aminoácido de baixo peso molecular, que funciona como um osmólito ativo (Farooq et al., 2009), já foi relatado em diversas plantas em resposta à seca (Coscolin et al., 2011; Ahmed et al., 2009). Houve pouca interação dos fatores entre plantas irrigadas e plantas sob SM no nosso trabalho, como observado pelos incrementos de prolina no clone [AEC2197](#) e reduções nos clones [VT04](#) e [AEC1528](#) (Figura 5D). Assim, é plausível sugerir que, ao menos nas condições do nosso trabalho, prolina tenha pouca, ou nenhuma importância na tolerância diferencial à seca em eucalipto.

Incrementos nos teores de glicose, frutose e sacarose em diferentes materiais genéticos foram observados (Figuras 6A-C) e, assim, um possível papel osmótico desses açúcares nas células não pode ser, efetivamente, descartado. Foi possível notar que 6 clones tolerantes ([VM01](#), [CO1275](#), [CO1445](#), [CO1277](#), [AEC2034](#) e [AEC2197](#)) e 2 clones sensíveis ([AEC1528](#) e [CNB016](#)) apresentaram incrementos nos teores de glicose em comparação aos respectivos controles. No entanto, os mesmos 6 clones tolerantes ([VM01](#), [CO1275](#), [CO1445](#), [CO1277](#), [AEC2034](#) e [AEC2197](#)) e 3 clones sensíveis ([AEC1528](#), [I144](#) e [CNB016](#)) apresentaram incrementos nos teores de frutose. Em adição, os teores de sacarose aumentaram em todos os clones avaliados e, sob SM, o clone [VM01](#) apresentou teores elevados de sacarose em relação aos demais clones. Cumpre mencionar que o aumento desses açúcares não foi acompanhado por alterações significativas nos teores de amido (Figura D). As alterações metabólicas ocorridas durante eventos de seca são processos dinâmicos que variam com a intensidade e duração da seca, bem como da sensibilidade dos materiais (Marček et al., 2019). Desse modo, açúcares como glicose e frutose, além de função osmótica, podem atuar como substrato respiratório e também na síntese de

outras moléculas, ao passo que a sacarose pode ainda ser transportada para órgãos drenos (Hartmann & Trumbore, 2016). Embora diferenças nos metabólitos tenham sido observados em resposta à seca, uma análise multivariada (PCA) desses dados não esteve associada à separação, de forma efetiva, de materiais genéticos considerados tolerantes e sensíveis (Figura 7).

A densidade estomática (número de estômatos por unidade de área) pode sofrer alterações desencadeadas tanto por fatores genéticos como ambientais (Bertolino et al., 2019). Não foi possível observar aqui quaisquer alterações na densidade estomática em função da variação do teor de umidade do solo (Tabela 1). Com efeito, os clones [VM01](#), [CO1275](#), [AEC2034](#), [AEC2197](#) e [AEC3000](#), quando submetidos à SM, tendem a manter a mesma densidade estomática que em CC. Por outro lado, materiais considerados mais sensíveis tendem a apresentar maior densidade estomática sob SM (Tabela 1). Entretanto, esse efeito pode ter sido ocasionado por uma redução da área foliar, gerando um “efeito de concentração” dos estômatos por unidade de área. Diferentemente dos resultados aqui obtidos, materiais ditos tolerantes e plásticos apresentaram incrementos na densidade estomática na face abaxial ao se avaliar oito clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à seca (Otto et al., 2017). Interessantemente, dos 12 clones aqui avaliados, apenas os clones considerados tolerantes apresentaram estômatos nas duas faces (anfiestomáticos). Registre-se que os materiais anfiestomáticos possuem base genética derivada de *E. camaldulensis*, material considerado tolerante à seca, ao contrário dos demais que são, predominantemente, oriundos de *E. urophylla* e *E. grandis*. Ao avaliarem os 8 clones de eucalipto, Otto e colaboradores, (2017) verificaram que clones que apresentaram estômatos nas duas faces tinham como base genética *E. urophylla* x *E. tereticornis* e *E. grandis* x *E. camaldulensis*. É plausível sugerir que clones oriundos de cruzamentos entre espécies consideradas tolerantes à seca, como *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. brassiana*, possam exercer, de alguma forma, influência direta na disposição dos estômatos. A anfiestomatia exerce papéis importantes, por exemplo, ao aumentar sítios de assimilação de CO₂ diminuindo a distância percorrida por esse gás até o mesófilo (Parkhurst & Mott, 1990). Em experimentos com *E. globulus* foi demonstrado que as superfícies foliares podem apresentar respostas independentes, em função da demanda evaporativa, induzindo, portanto, um fechamento estomático diferenciado

(Richardson et al., 2017). Esse funcionamento “independente” dos estômatos pode justificar, aos menos em parte, a menor temperatura foliar, bem como o aporte de carbono em condições de deficiência hídrica, como ora observado em nosso trabalho.

Não apenas os mecanismos de tolerância à seca previamente mencionados, mas também as características anatômicas são importantes para a compreensão das estratégias adotadas pelas plantas. Assim, sob limitação hídrica, observa-se diminuição na densidade estomática, decréscimos dos espaços intercelulares, com a presença de duas ou mais camadas de parênquima paliçádico (Gomes, 2013), aumento na densidade de venação (Boer et al., 2016), dentre outras modificações. Cumpre mencionar que alterações na espessura dos tecidos são também evidenciadas em condições de seca. Neste contexto, verificou-se que a SM levou a reduções na espessura de células do mesofilo e, conseqüentemente, decréscimos no tamanho das células em oito clones de eucalipto (Otto et al., 2017). Essa redução da espessura da folha aliada a maior espessura do parênquima paliçádico foi também notada em híbridos de *E. camaldulensis* x *E. tereticornis* submetidos ao déficit hídrico (Nautiyal et al., 1994). Embora tenha havido tendência de reduções na espessura do mesofilo em clones tolerantes (Tabela 2), a SM não promoveu diferenças entre clones e teor de umidade do solo. Todavia, em condições de campo, clones de eucalipto considerados tolerantes à seca sob limitada disponibilidade hídrica, apresentaram redução dos espaços intercelulares em comparação aos clones de média e baixa tolerância, particularmente em folhas do ápice, terço médio e base, sendo essa uma das principais características de plantas xeromórficas (Gomes, 2013). Em decorrência da redução de espaços intercelulares há também compactação do mesofilo e, com isso, aumenta-se a resistência interna ao movimento de água, diminuindo perdas de água por evaporação (Machado, 2004). Aqui, a SM não promoveu alterações na porcentagem de espaços intercelulares; entretanto, características intrínsecas aos materiais genéticos, principalmente nos clones tolerantes, foram observadas. Dentre os clones avaliados, clones como [CO1275](#), [CO1445](#), [CO1277](#), [AEC2197](#) e [AEC3000](#), apresentaram menor porcentagem de espaços intercelulares tanto sob SM quanto em CC.

A anatomia dos vasos condutores permite também compreender estratégias utilizadas pelas plantas sob condições de limitação hídrica, a fim de obter melhor segurança hidráulica. Em sua revisão, Saadaoui et al., (2017) abordaram a anatomia

de 28 espécies de eucalipto distribuídas em solos com diferentes níveis de aridez na Austrália e observou-se que, à medida que a aridez aumenta, ocorre uma diminuição dos diâmetros dos vasos acoplada ao aumento da frequência dos mesmos. Em consonância, resultados semelhantes foram aqui observados, como, por exemplo, o aumento do número de vasos do xilema nos clones [VM01](#), [CO1275](#), [CO1277](#), [AEC1528](#), [GG100](#) e [CNB016](#) sob SM em comparação à CC. Em adição, a redução do diâmetro e área média do xilema foi observada nos clones [CO1275](#), [AEC2034](#), [AEC1528](#) e [GG100](#), sugerindo a ocorrência dessa estratégia de “compensação” para lidar com a baixa disponibilidade hídrica. Cumpre ressaltar também as variáveis morfoanatômicas possibilitaram a separação de clones tolerantes e sensíveis sendo, portanto, variáveis importantes para seleção de materiais genéticos mais tolerantes à seca.

Tomadas em conjunto, as avaliações realizadas aqui apresentam-se como de grande relevância para trabalhos futuros tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo. Com efeito, a busca por bioindicadores de tolerância à seca tem se mostrado uma estratégia promissora para seleção de materiais de eucalipto em programas de melhoramento genético florestal com essa finalidade. Neste contexto, trabalhos futuros utilizando um gama maior número de clones de eucalipto bem como cruzamentos entre esses e outros materiais podem ser de fundamental importância na obtenção de eucaliptos tolerantes à seca, além de permitir uma melhor compreensão dos mecanismos adotados por esses materiais quando submetidos à limitada disponibilidade hídrica.

Dessa maneira, o uso de bioindicadores de tolerância à seca almejado há um bom tempo no setor florestal brasileiro, através desse trabalho poderá ser utilizado em escala operacional, agregando-se as demais técnicas de seleção de material genético superior em áreas de déficit hídrico.

5- CONCLUSÕES

Em síntese, alterações morfológicas, fisiológicas e anatômicas foram apresentadas pelos clones tolerantes em comparação aos clones sensíveis à restrição hídrica.

- Certos materiais, tidos como tolerantes, a exemplo do clone VM01, foram pouco sensíveis quando cultivados sob condições de SM e apresentaram valores similares a plantas controle no que se refere à massa seca de folhas e de ramos e, biomassa da parte aérea. Isso pode significar que o grau de restrição hídrica aplicado não tenha sido o suficientemente forte para afetar este material genético;
- Avaliações termográficas foram capazes de discriminar materiais genéticos quanto à tolerância, sendo, portanto, uma ferramenta importante na discriminação dos genótipos tolerantes à seca;
- A razão entre clorofila a/b, clorofilas totais, aminoácidos totais, prolina, proteínas solúveis totais, glicose, frutose, sacarose e amido, não foram sensíveis à condição hídrica imposta e não permitiram distinguir os materiais no que se refere à tolerância à seca;
- Em relação a densidade estomática apenas os clones tolerantes apresentaram estômatos nas duas faces foliares. Tomados em conjunto com essas variáveis, a anatomia de folhas e pecíolo parecem ser potenciais bioindicadores de tolerância à seca, uma vez que permitiram separar materiais genéticos e evidenciar características importantes para lidar com este importante estresse.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed CB, Rouina BB, Sensoy S, Boukhris M, Abdallah FB (2009) Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany* 67 (2): 345-352.

Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR (2011) Protein degradation an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends in Plant Science* 16: 489-498.

Bertolino LT, Caine RS, Gray JE (2019) Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. *Frontiers Plant Science* 10: 225.

Biju S, Fuentes S, Gupta D (2018) The use of infrared thermal imaging as a non-destructive screening tool for identifying drought-tolerant lentil genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 11-24.

Boer HJde, Drake PL, Wendt E, Price CA, Schulze ED, Turner NC, Nicolle D, Veneklaass EJ (2016) Apparent overinvestment in leaf venation relaxes leaf

morphological constraints on photosynthesis in Arid habitats. *Plant Physiology* 172: 2286-2299.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

Correia B, Hancock RD, Amaral J, Gomez-Cadenas A, Valledor L, Pinto G (2018) Combined drought and heat activates protective responses in *Eucalyptus globulus* that are not activated when subjected to drought or heat stress alone. *Frontiers in Plant Science* 9: 819.

Correia B, Valledor L, Hancock RD, Renaut J, Pascual J, Soares AMVM, Pinto G (2016) Integrated proteomics and metabolomics to unlock global and clonal responses of *Eucalyptus globulus* recovery from water deficit. *Metabolomics* 12: 141.

Coscolin, RBS, Broetto F, Marchese JA, Campohermoso MC, Paladini MV (2011) Effects of hydric deficiency on gas exchange parameters and metabolism of *Eucalyptus grandis* clones. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23 (4): 255-262.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29 (1): 185-212.

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.

Gomes LML. Características morfofisiológicas associadas à restrição hídrica em clones de eucalipto. 37 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

Guo Y, Yu H, Kong D, Yan F, Liu D, Zhang Y (2015) Effects of gradual soil drought stress on the growth, biomass partitioning, and chlorophyll fluorescence of *Prunus mongolica* seedlings. *Turkish Journal of Biology* 39: 532-539.

Hamanishi ET, Barchet GLH, Dauwe R, Mansfield SD, Campbell MM (2015) Poplar trees reconfigure the transcriptome and metabolome in response to drought in a genotype-and time-of-day-dependent manner. *BMC Genomics* 16: 329.

Hartmann H & Trumbore S (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees - from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist* 211: 386-403.

Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH (2009) Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology* 36: 978–989.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.

Lyon D, Castillejo MA, Mehmeti-Tershani V, Staudinger C, Kleemaier C, Wienkoop S (2016) Drought and recovery: Independently regulated processes highlighting the importance of protein turnover dynamics and translational regulation in *Medicago truncatula*. *Molecular & Cell Proteomics* 15(6): 1921-37.

Ma F, Xu TT, Ji MF, Zhao CM (2014) Differential drought tolerance in tree populations from contrasting elevations. *AoB PLANTS* 6: plu069.

Machado AV. Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* Mart. (Chloranthaceae). 53 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004.

Marček T, Hamow KÁ, Végh B, Janda T, Darko E (2019) Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. *Plos One* 14(2): e0212411.

Maseda PH & Fernández RJ (2016) Growth potential limits drought morphological plasticity in seedlings from six *Eucalyptus* provenances. *Tree Physiology* 36: 243-251.

Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte FM, Delay D, Petit JM, Barbaroux C, Thiec DL, Bréchet C, Brignolas F (2006) Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* 169: 765-777.

Nautiyal S, Badola HK, Pal M, Negi DS (1994) Plant responses to water stress: changes in growth, dry matter production, stomatal frequency and leaf anatomy. *Biologia Plantarum* 36 (1): 91-97.

Otto MSG, Francisco JG, Gonzalez BT, Calvo LA, Mattos EM, Almeida M, Moral RA, Demétrio CGB, Stape JL & Oliveira RF (2017) Changes in γ -aminobutyric acid concentration, gas exchange, and leaf anatomy in *Eucalyptus* clones under drought stress and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 208.

Parkhurst DF & Mott KA (1990) Intercellular diffusion limits to CO₂ uptake in leaves. *Plant Physiology*. 94: 1024-1032.

Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB, Daloso DM, Pham PA, Barros KA, Engqvist MK, Florian A, Krahnert I, Maurino VG, Araújo WL, Fernie AR (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environment* 39:1304-1319.

Pita P, Pardos JA (2001) Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. *Tree Physiology* 21: 599-607.

Poorter H, Niinemets U, Poorter L, Wright IJ, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182: 565-588.

Richardson F, Brodribb TJ, Jordan GJ (2017) Amphistomatic leaf surfaces independently regulate gas exchange in response to variations in evaporative demand. *Tree Physiology* 37: 869–878.

Saadaoui E, Ben Yahia K, Dhahri S, Ben Jamaa ML, Khouja MJ (2017) An overview of adaptative responses to drought stress in *Eucalyptus* spp. *Forestry Studies Metsanduslikud Uurimused* 67: 86–96.

Silva EC., Nogueira Rejane JMC., Vale Fernando HA, Melo Natoniel F de, Araújo Francisco P de (2009) Water relations and organic solutes production in four umbu tree (*Spondias tuberosa*) genotypes under intermittent drought. *Brazilian Journal Plant Physiology* 21 (1): 43-53.

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

Yemm EW & Cocking EC (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* 80: 948.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DE BIOINDICADORES DE TOLERÂNCIA À SECA EM EUCALIPTO CULTIVADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Por serem organismos sésseis, as plantas estão constantemente sujeitas as variações ambientais que as cercam (Golldack et al, 2013). Portanto, a compreensão de mecanismos fisiológicos utilizados pelas plantas no ambiente em que elas estão inseridas nos permite identificar qual a melhor forma de conduzir os cultivos tanto de espécies agrícolas quanto florestais (Otto et al., 2017). Não obstante, esse maior entendimento pode permitir a seleção de materiais tolerantes aos mais diversos tipos de estresse, como por exemplo deficiência hídrica e os extremos de temperatura (Otto et al., 2017, Das et al, 2017; Eremina et al, 2016).

A deficiência hídrica é um estresse que acomete diferentes culturas, e afeta processos vitais como os parâmetros de trocas gasosas. Cumpre mencionar que, em decorrência desse estresse, aproximadamente 150.000 hectares de florestas plantadas foram perdidos, somente no ano de 2014, em Minas Gerais (Diário do Comércio, 2015). Com efeito, isso serviu como alerta para o setor florestal para uma possível recorrência desse fenômeno devido às recentes mudanças climáticas ao longo de todo o globo. Nesse sentido, a busca por materiais tolerantes à seca faz-se extremamente necessário e tem sido alvo de diferentes estudos.

Em decorrência da limitação hídrica no solo, as plantas respondem reduzindo a condutância estomática bem como a transpiração, sendo que essa resposta pode ser mediada pelo acúmulo de ácido abscísico (Mitchell et al., 2017). O declínio ocorrido na condutância estomática com o avanço da deficiência hídrica, conseqüentemente irá promover reduções tanto na transpiração como na taxa fotossintética (Creek et al., 2018; Correia et al., 2018). Isso desencadeia a redução na disponibilidade de carboidratos e conseqüentemente afetar o investimento destes no crescimento da planta. Utilizando-se plantas de *E. globulus* submetidas à restrição hídrica verificou-se a formação de dois grupos bem distintos, sendo que em um deles as plantas exibiram eficiência no controle estomático e reduções no crescimento,

enquanto em um segundo grupo as plantas exibiram menor controle estomático e maior taxa de crescimento (Granda et al., 2014).

A seca pode alterar também a área foliar específica (AFE), que corresponde à razão entre área e acúmulo de biomassa. Essa razão permite inferir sobre o acúmulo de biomassa por unidade de área (Poorter et al., 2009) e é uma característica relacionada com o crescimento da planta (Cheng et al. 2016). Nesse sentido, decréscimos em AFE foram observados em clone de *E. camaldulensis* e redução no crescimento da parte aérea (Amrutha et al., 2019). Além disso de reduções em AFE, reduções em altura e biomassa podem ser visualizados sob condições de seca em eucalipto (Correia et al., 2013).

Apesar dos possíveis danos causados pela redução ou mesmo ausência de água disponível, plantas podem responder positivamente ao aumento do conteúdo de água no solo. Coscolin et al, (2011) verificaram que a atividade fotossintética foi restaurada parcialmente em clones de eucalipto submetidos a ciclos de seca e reidratação. Já Correia et al. (2013) verificaram o restabelecimento das trocas gasosas a valores similares ao controle em clones de eucalipto após uma semana de reidratação. Ademais, alterações morfoanatômicas são observadas em plantas sob seca e podem auxiliar na discriminação de genótipos. Dessa forma, é observado que a limitação hídrica promove alterações na densidade estomática, redução de espaços intercelulares (Gomes, 2013), aumento na densidade de venação (Boer et al., 2016), alterações na espessura de tecidos (Otto et al., 2017), dentre outras alterações.

A aquisição de nutrientes em locais de limitação hídrica é também limitada. Müller et al. (2017), ao avaliarem os efeitos do fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K) e boro (B) em diferentes clones de eucalipto sob limitação hídrica, verificaram que os clones podem ser discriminados com base na capacidade de absorção de Ca e Mg. Vale ressaltar também, que esses mesmos autores observaram que clones tolerantes e sensíveis apresentavam diferenças na eficiência de absorção e uso de nutrientes.

Tendo em vista diferentes mecanismos adotados pelas plantas, bem como sua plasticidade, entender quais as estratégias adotadas por diferentes materiais, principalmente plantas de eucalipto, permitirão identificar variáveis importantes para selecionar clones tolerantes à seca. Um experimento extra e maior utilizando 12 clones de eucalipto (Capítulo I) foi conduzido em casa de vegetação pelo nosso grupo,

onde foi possível avaliar variáveis consideradas promissoras para discriminação dos clones de eucalipto tolerantes à seca. Neste trabalho, foram utilizados cinco clones de eucalipto (tolerantes e sensíveis) considerados promissores, que foram previamente selecionados de experimento anterior com o objetivo de validar os bioindicadores encontrados no experimento I, bem como a seleção de outros bioindicadores.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Seleção dos materiais genéticos e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45'S e 42° 52'W, 672 m) sob condições semi controladas. Selecionaram-se cinco clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância à deficiência hídrica de acordo com experimentos prévios realizados por Pita-Barbosa 2017 (dados não publicados) e com o ranking realizado pelas empresas do setor florestal, sendo os clones tolerantes: **VM01** (E. urophylla x E. camaldulensis), **CO1275** (E. camaldulensis x E. spp), **CO1445** (E. urophylla x E. camaldulensis) e sensíveis: **I144** (Eucalyptus grandis x Eucalyptus urophylla) e **CNB016** (E. urophylla (híbrido espontâneo). As mudas foram previamente cultivadas em tubete e posteriormente transferidas para vasos plásticos com capacidade de 21 L contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1. Superfosfato simples foi misturado ao substrato de modo a fornecer 200 mg/dm³ de P. Após o preparo do solo e transplântio das mudas para os vasos, as mesmas foram aclimatadas às condições ótimas, com a umidade do solo próxima a 100% da capacidade de campo (CC) por cerca de 60 dias. Após o pegamento das mudas, uma adubação NPK 20-05-20, 300mg/L de solo, foi aplicada à superfície do vaso, juntamente com ácido bórico-1 mg/L, cloreto de cobre- 1,33 mg/L e sulfato de zinco-4 mg/L). As doses dos fertilizantes foram determinadas com base na análise química da mistura. Essa adubação de cobertura foi aplicada a cada 30 dias.

Uma vez aclimatadas, metade das plantas foi submetida à seca moderada, de forma gradual, até a umidade do solo atingir 70% da CC, permanecendo sob essa condição por aproximadamente 120 dias, enquanto que a outra parte permaneceu próximo à 100% da CC. Para isso, gerou-se uma curva de calibração para controle

diário da umidade do solo. Com um sensor de umidade aferiu-se a umidade do solo e o mesmo foi coletado para análise de umidade em laboratório e, baseado nesses valores gerou-se uma regressão e a equação obtida foi utilizada para o ajuste da umidade. O teor de umidade correspondente à CC foi determinado saturando-se o solo com água até ocorrer a drenagem. Cessado esse processo, amostras foram coletadas e lavadas à estufa para secagem, determinando-se a quantidade de água retida. Após drenagem aferiu-se a umidade com o sensor e o valor obtido foi utilizado na curva de calibração.

Após esse período de estresse, as plantas previamente submetidas à SM foram expostas à seca severa (SS), com a suspensão total da irrigação. O potencial hídrico (Ψ_w) foi verificado diariamente na antemanhã até atingir aproximadamente -3 Mpa, bem como a observação de danos visíveis causados pela seca. Ao atingir esse ponto, as plantas foram reidratadas e mantidas nessa condição até parâmetros de recuperação, como incrementos na taxa fotossintética, retornassem a valores similares aos controles serem evidenciados. Em cada um dos pontos: i) aos 120 dias sob 70% da CC; ii) seca severa, (Ψ_w de aproximadamente -3,00 Mpa) e iii) reidratação, amostras para análises bioquímicas foram coletadas e imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C para posteriores análises.

2.2- Avaliações biométricas e quantificação de biomassa

Ao longo de todo o experimento foi mensurada a altura e diâmetro das plantas com auxílio de fita métrica e paquímetro, respectivamente. Ao final do experimento as plantas foram divididas em folhas, caules, ramos e raiz para determinação da biomassa. Para isso, esses componentes foram acondicionados em sacos de papel e mantidos em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até obtenção de massa constante.

2.3- Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Foram aferidos os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em plantas sob SM e após reidratação, bem como as plantas controle (CC). Para isso, utilizou-se um sistema aberto com analisador de gases infravermelho (IRGA, LI-COR Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) com fluorômetro acoplado (LI-COR Inc LI-6400-40,

Lincoln, EUA) no período entre 8:00 e 12:00 h (horário local). As características avaliadas foram: taxa de assimilação líquida do carbono (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO₂ (C_i), transpiração (E), quenching fotoquímico (qP) e taxa de transporte de elétrons (J_{flu}) utilizando intensidade luminosa artificial de 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 10% de luz azul, concentração de CO₂ em torno de 400 ppm e umidade relativa do ar entre 45-70%. Para a determinação da fluorescência da clorofila a utilizou-se o fluorômetro acoplado ao IRGA no mesmo momento de medição de A.

2.4- Avaliações termográficas

Para comparação da temperatura foliar de todos os clones sob SM, folhas completamente expandidas foram coletadas do terço médio e colocadas lado a lado e, então, fotografadas com câmera no infravermelho (FLIR systems T360, Nashua, USA).

2.5- Determinação dos teores de pigmentos, açúcares solúveis, aminoácidos totais, amido e proteínas solúveis totais

Amostras previamente coletadas como descritos acima (item 2.1) foram liofilizadas, alíquotadas e submetidas a extração metanólica à quente segundo Lisec et al., (2006), exceto pela adição do padrão ribitol. A determinação dos teores de pigmentos (clorofilas a e b) foi realizada como descrito por Wellburn (1994). Os teores de proteínas solúveis totais e de aminoácidos totais foram determinados conforme previamente descrito por Bradford (1976) e Yem et al. (1955), respectivamente. Os teores de amido e açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram determinados segundo Fernie et al. (2001).

2.6- Determinação da área foliar específica

Aproximadamente 15 folhas completamente expandidas do terço médio foram coletadas e digitalizadas em scanner (hp ScanJet 200). Em seguida, elas foram colocadas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. A área foliar específica foi determinada pela razão entre a área foliar (cm^2) e a massa seca (g) de folhas sob SM.

2.7- Densidade estomática por diafanização

A densidade estomática de folhas desenvolvidas durante o período de seca foi determinada em amostras, sendo a folha seccionada em sua região mediana e fixada em Formaldeído, ácido acético e etanol 50% (FAA 50%) por 48 h. Em seguida, essas folhas ficaram por 48 h em metanol, posteriormente clarificadas com água sanitária comercial e, por fim, colocadas em ácido láctico a 60 °C em estufa. Ao final desse processo as folhas ficaram transparentes e puderam ser observadas ao microscópio com câmera acoplada, fotografadas e, a partir das imagens obtidas, o número de estômatos foi contabilizado.

2.8- Variáveis anatômicas

Folhas desenvolvidas durante o período de seca foram coletadas e previamente fixadas em (FAA 50%) por 48 horas e armazenadas em etanol 70%. Elas foram subamostradas, retirando-se um fragmento na região que contém a nervura principal das folhas. Esse material foi incluído em metacrilato e, após a polimerização, foram realizados cortes de 5 mm de espessura e corados, a posteriori, com azul de toluidina. Avaliou-se a espessura das epidermes inferior e superior, espessura do mesofilo, espessura total da folha e proporção de espaço intercelular. O pecíolo foi também coletado para obtenção de cortes anatômicos para avaliação do número e do diâmetro de vasos do xilema.

2.9- Análises nutricionais

Folhas completamente expandidas, ramos e raízes foram coletadas em plantas crescidas em solo com umidade correspondente a 70% da capacidade de campo (SM, seguido de SS e RI), para avaliação nutricional. Foram quantificados os teores de potássio, magnésio, cálcio, cobre e zinco, de acordo com Giesecking et al. (1935).

2.10- Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados num esquema fatorial 5x2 (5 clones de eucalipto e 2 regimes hídricos). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). As médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para a avaliação das premissas de

normalidade dos resíduos aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R.

2.11- Análise de componentes principais

Os dados foram normalizados utilizando logaritmo na base 2 (\log_2), e em seguida, submetidos às análises utilizando-se o software MiniTab.

3- RESULTADOS

3.1- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono

Os resultados obtidos para o crescimento e acúmulo de biomassa referem-se às avaliações realizadas ao final do experimento, isto é, após as plantas terem sido mantidas a SM, SS e RI. Assim, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas entre plantas controle e tratadas no que respeita a altura e diâmetro final, tendências de reduções em todos os clones sob seca para ambos os parâmetros foram evidentes (Figuras 1A-B e Figura 2). Sob condição controle, o clone **CO1445** apresentou maior altura e diâmetro de caule, enquanto os clones **VM01**, **I144** e **CNB016** apresentaram os menores valores para ambas as características. Não se observou qualquer variação em diâmetro entre os clones quando a plantas foram RI; no entanto, maiores valores para altura foram verificados para os clones **CO1275** e **CO1445** nessa condição.

Foi possível verificar também, para a massa seca de folha, caule e parte aérea (Figura 1C, E e G, respectivamente), a ocorrência de interação de fatores clones e teores de umidade do solo. Assim, uma redução acentuada nesses parâmetros foi observada para todos os clones sob seca (SM e SS), os quais não diferiram entre si quando comparados apenas nessa condição. O clone **CO1445** apresentou, sob condições controle, os maiores valores para todos esses parâmetros ao passo que os demais clones não diferiram entre si.

Não foram observadas variações de comportamento entre os clones quando comparadas as condições controle (CC) e de seca (SM e SS) para as demais variáveis relacionadas à biomassa (Figura 1D, F e H), embora tendência de redução para massa seca de ramos e raiz tenha sido observada. A massa seca de ramos não sofreu variação sob condições controle; no entanto, sob seca (SM e SS), apenas o clone

CO1445 apresentou redução. Apesar de a massa seca de raiz apresentar uma tendência de similaridade entre os clones, um incremento para o clone I144 foi verificado apenas em condição controle. Não houve interação dos clones e teores de umidade do solo para a razão raiz/parte aérea. Em ambas as condições, o clone I144 apresentou os maiores valores de razão raiz/parte aérea, enquanto nenhuma variação foi verificada nos demais clones (Figura 1H).

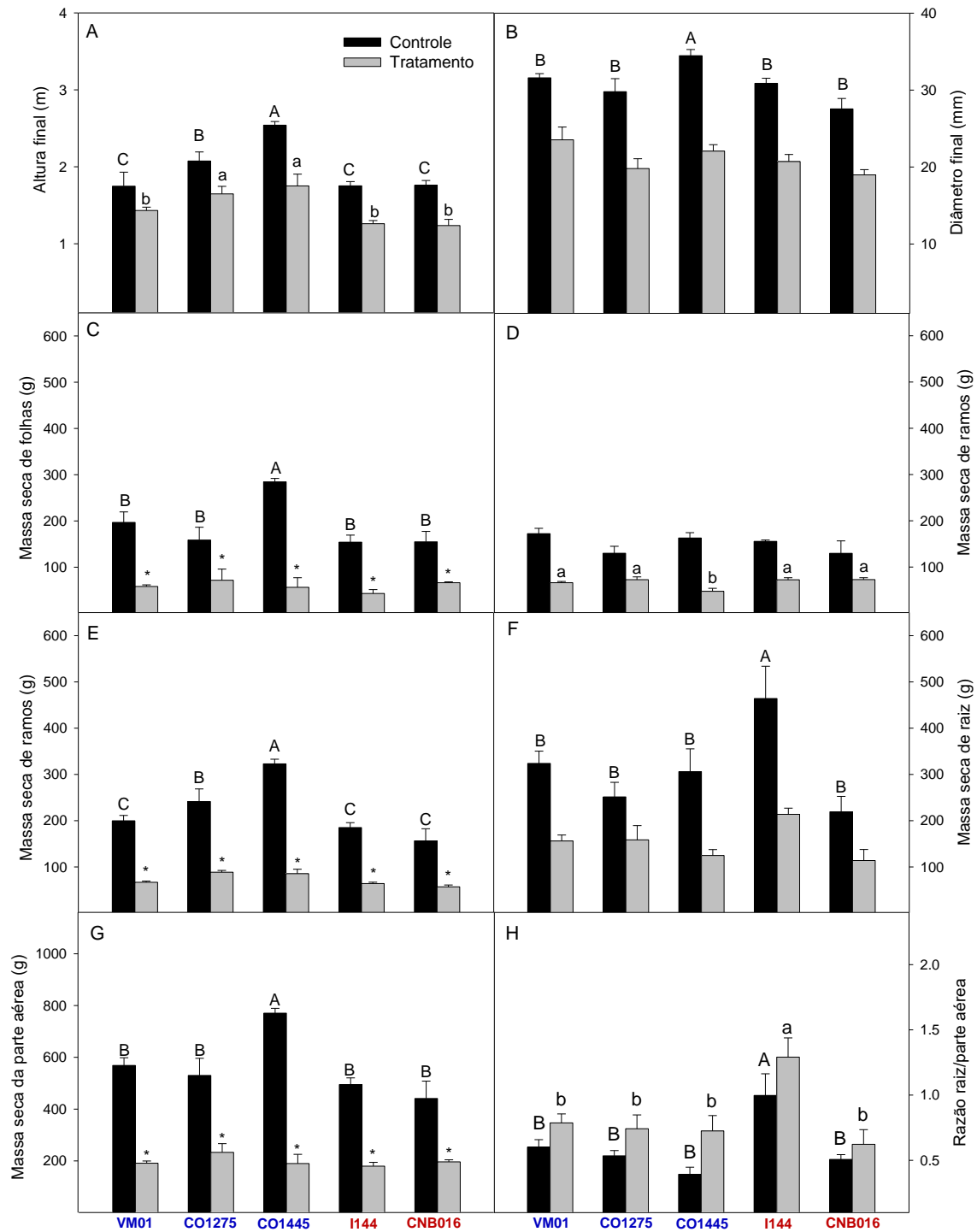


Figura 1- Características de crescimento e produção de cinco clones de eucalipto com tolerância diferencial à seca submetidos a quatro condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo - (CC- controle), plantas mantidas a 70% da capacidade de campo (SM- seca moderada), seca severa (SS) e reidratação (RI)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: altura final (A), diâmetro final (B), massa seca de folhas (C), massa seca de ramos (D), massa seca de caule (E), massa seca de raiz (F), massa seca da parte aérea (G) e razão raiz/parte aérea (H). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob seca (SM e SS) e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e estresse de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

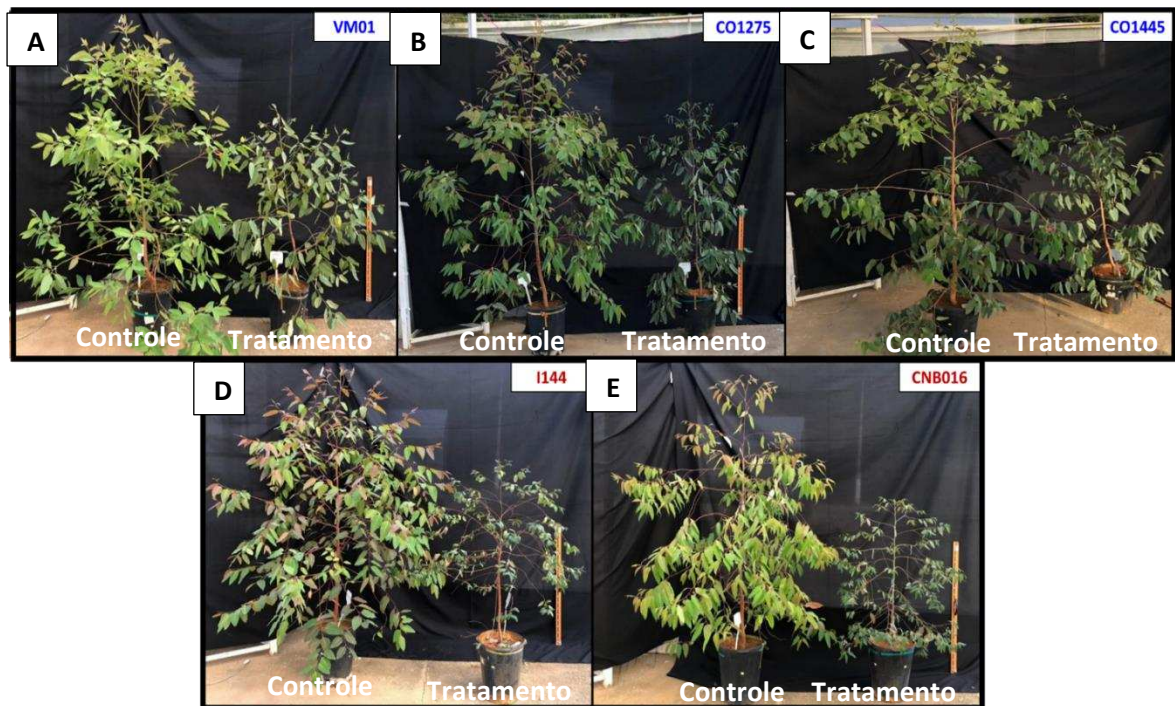


Figura 2- Imagens representativas de plantas controle (esquerda) e sob seca (direita) ao final do ciclo de estresse (SM, SS e RI) com 120 dias de tratamento. Clones em azul são tolerantes e em vermelho clones sensíveis.

Os dados biométricos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), verificando-se que os dois primeiros componentes representam 89,4% da variância total dos dados (Figura 3). As maiores variações (69,6%) foram observadas ao longo do PC1 (eixo X), e a biomassa da parte aérea e do caule foram as variáveis que mais contribuíram, enquanto a área foliar específica (AFE) contribuiu para o PC2 (19,8%). Em função da contribuição das variáveis analisadas, foi observada a formação de 4 grupos distintos, destacando-se: **CO1445_C** (grupo 1- azul); **VM01_C**, **CO1275_C**, **I144_C** e **CNB016_C** (grupo 2- laranja); **VM01_S**, **CO1275_S** e **CO1445_S** (grupo 3- verde); e **I144_S** e **CNB016_S** (grupo 4- cinza).

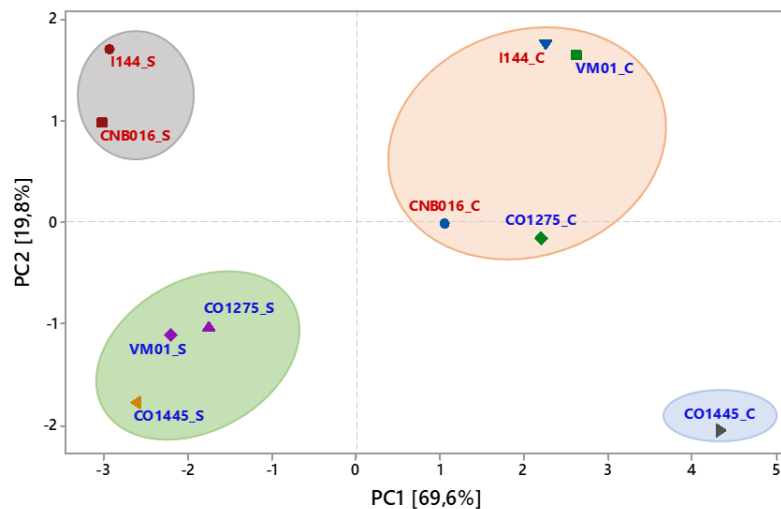


Figura 3- Análise de componentes principais (PCA) baseada em dados biométricos obtidos em clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob CC (C) e estresse [(SM, SS e RI) (S)]. De acordo com a contribuição das variáveis foi observada a formação de 4 grupos distintos. grupo 1: azul claro (CO1445_C); grupo 2- laranja: (VM01_C, CO1275_C, I144_C e CNB016_C); grupo 3-verde: (VM01_S, CO1275_S e CO1445_S); e S grupo 4-cinza (I144_S e CNB016).

3.2- Impactos da deficiência hídrica na alocação do carbono

A fim de se verificar os impactos da deficiência hídrica, as trocas gasosas foram mensuradas em plantas de eucalipto submetidas à SM e RI, bem como às CC. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas na taxa fotossintética (A_N), há tendência de redução em plantas mantidas a SM para todos os clones (Figura 4A). Em CC, os clones tolerantes (VM01, CO1275 e CO1445) apresentam maiores A_N que os clones sensíveis sem, no entanto, diferirem entre si. Embora apresente tendência similar à A_N , interação dos fatores entre clones e teor de umidade do solo foi observado para condutância estomática (g_s), com reduções em todos os clones sob SM (Figura 4B), os quais não diferiram entre si. Por outro lado, em plantas sob CC, incrementos em g_s foram observados para os clones VM01, CO1275 e I144.

De maneira semelhante à g_s , a interação clone x níveis de umidade do solo afetou a concentração interna de CO_2 (C_i). Houve redução da C_i nos clones VM01, CO1275, CO1445 e I144 quando submetidas à SM (Figura 4C). O clone CNB016 foi o único em que a C_i não diferiu entre os teores de umidade do solo. Em CC, não foram verificadas alterações entre os clones.

Verificou-se também um comportamento similar à g_s ao se comparar a transpiração (E) e a g_s , ainda que o clone CNB016 tenha apresentado menores E em

condição controle, dentre os clones avaliados (Figura 4D). Não se observaram quaisquer alterações para o quenching fotoquímico (qP) entre clones e/ou tratamentos (Figura 4E). Em geral, o comportamento da taxa de transporte de elétrons (J_{flu}) foi similar entre os clones em ambos os tratamentos e os clones sensíveis apresentaram menores valores nas duas condições (Figura 4F). Ao se comparar os clones dentro dos tratamentos, verificou-se reduções significativas nesse parâmetro em todos os clones submetidos à restrição hídrica, exceto para o **CNB016**.

Após todo ciclo de estresse ao qual as plantas foram submetidas (SM e SS), realizou-se a RI das mesmas. Nesse sentido, as variáveis de trocas gasosas foram avaliadas com o intuito de verificar a recuperação desses materiais. Assim, a recuperação plena foi considerada em plantas previamente reidratadas cujos valores de trocas gasosas retornassem à valores similares aos observados nas plantas controles. Para todas as variáveis analisadas, (A_N), (g_s), (C_i), (E), (qP) e (J_{flu}) não foram observadas interação entre clones de teor de umidade de solo, embora tendências de incrementos dessas variáveis em plantas RI foram notadas (Figura 4).

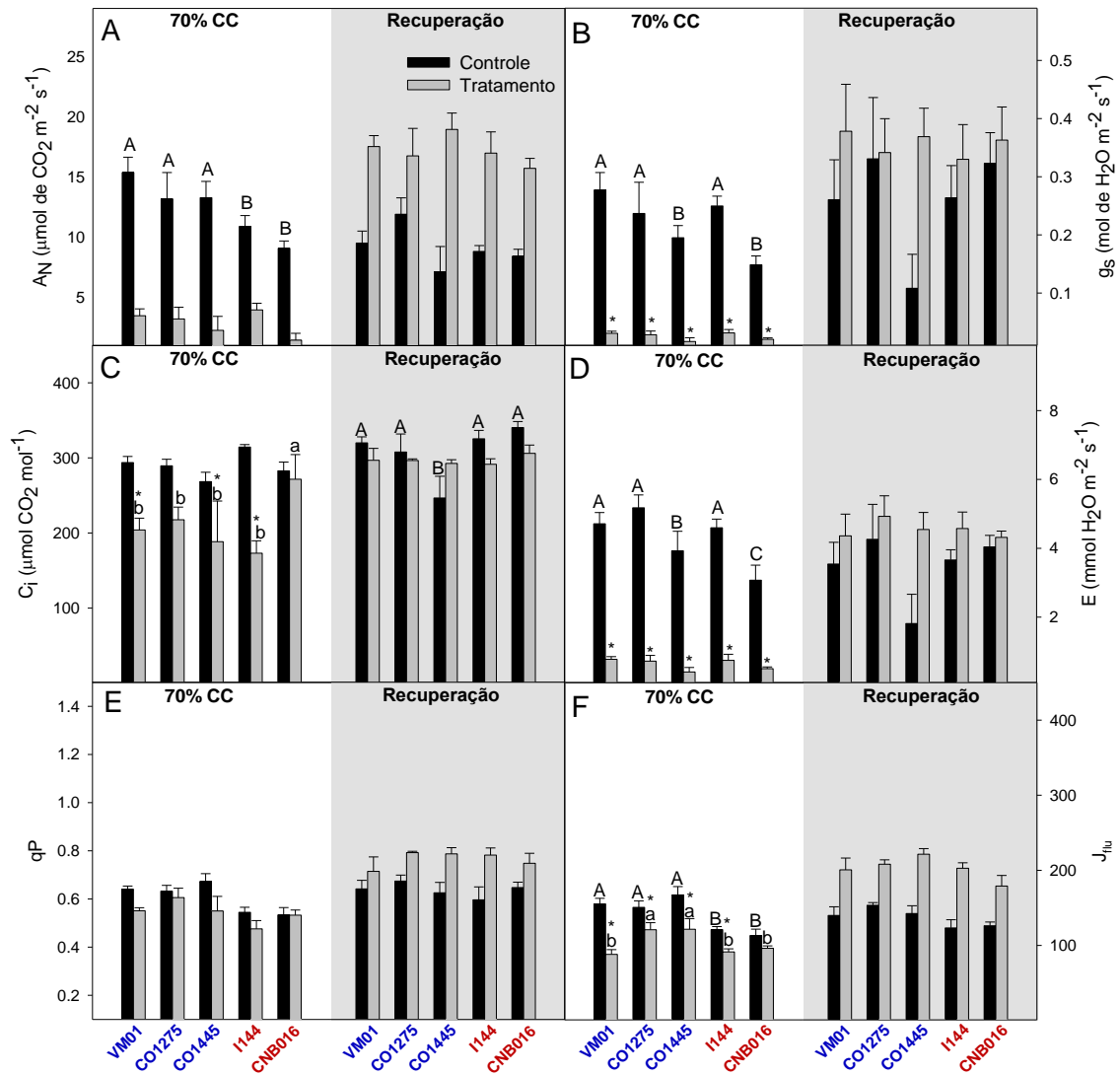


Figura 4- Trocas gasosas em cinco clones de eucalipto submetidos a quatro condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% capacidade de campo (CC-control), plantas sob 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada), seca severa (SS) e recuperação (RI)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: fotossíntese (A), condutância estomática (B), concentração interna de CO_2 (C), transpiração (D), quenching fotoquímico (E) e taxa de transporte de elétrons (F). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e RI, e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e estresse de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

Os dados de trocas gasosas foram submetidos à análise de componentes principais (PCA), verificando-se que os dois primeiros componentes representam 87,4% da variância total dos dados (Figura 5). As maiores variações foram observadas

ao longo do eixo X, PC1 (66,9%) e teve a g_s sob seca e A_n de plantas reidratadas como as variáveis que mais contribuíram para o PC1, enquanto a g_s em plantas reidratadas contribuiu para o PC2 (20,5%). Em função da contribuição das variáveis, foi observada a formação de 3 grupos distintos. O primeiro grupo é formado pelos clones em condições controle (plantas próximas à CC- amarelo) sendo eles, VM01_C, CO1275_C, I144_C e CNB016_C. O grupo 2 (azul) é formado unicamente pelo clone CO1445_C e o terceiro grupo (vermelho) é composto por clones tolerantes e sensíveis cultivados em condições de seca (VM01_S, CO1275_S, CO1445_S, I144_S e CNB016_S).

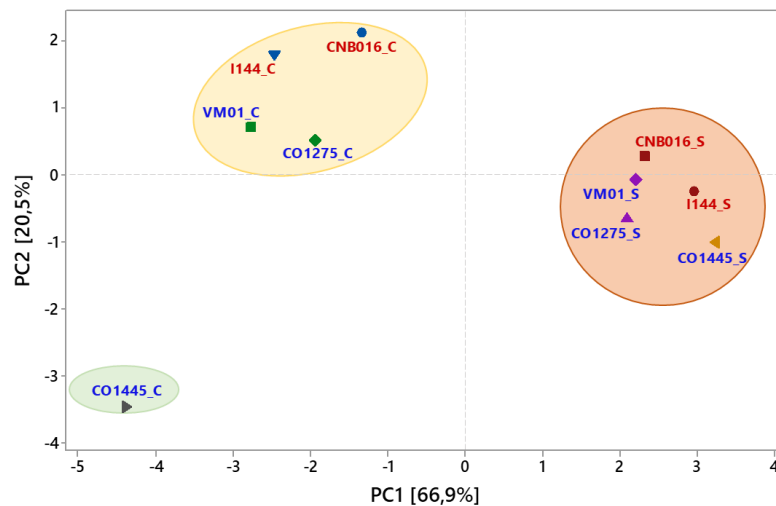


Figura 5- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados de trocas gasosas de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob CC (C) e estresse [(SM e RI) (S)]. De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 3 grupos distintos. Grupo 1-amarelo (VM01_C, CO1275_C, I144_C e CNB016_C); grupo 2- azul (CO1445_C); e grupo 3- vermelho: (VM01_S, CO1275_S, CO1445_S, I144_S e CNB016_S).

3.3- Termografia em plantas sob seca

De acordo com a escala de cores das imagens, nota-se que os clones VM01 e CO1275 (clones tolerantes) e I144 (clone sensível) apresentaram superfícies foliares mais frias em comparação aos demais clones sob SM (Figura 6). Por outro lado, os clones CO1445 e CNB016 apresentam, aparentemente, maiores dificuldades de dissipação de energia na forma de calor e, portanto, apresentaram maiores temperaturas foliares (Figura 6).

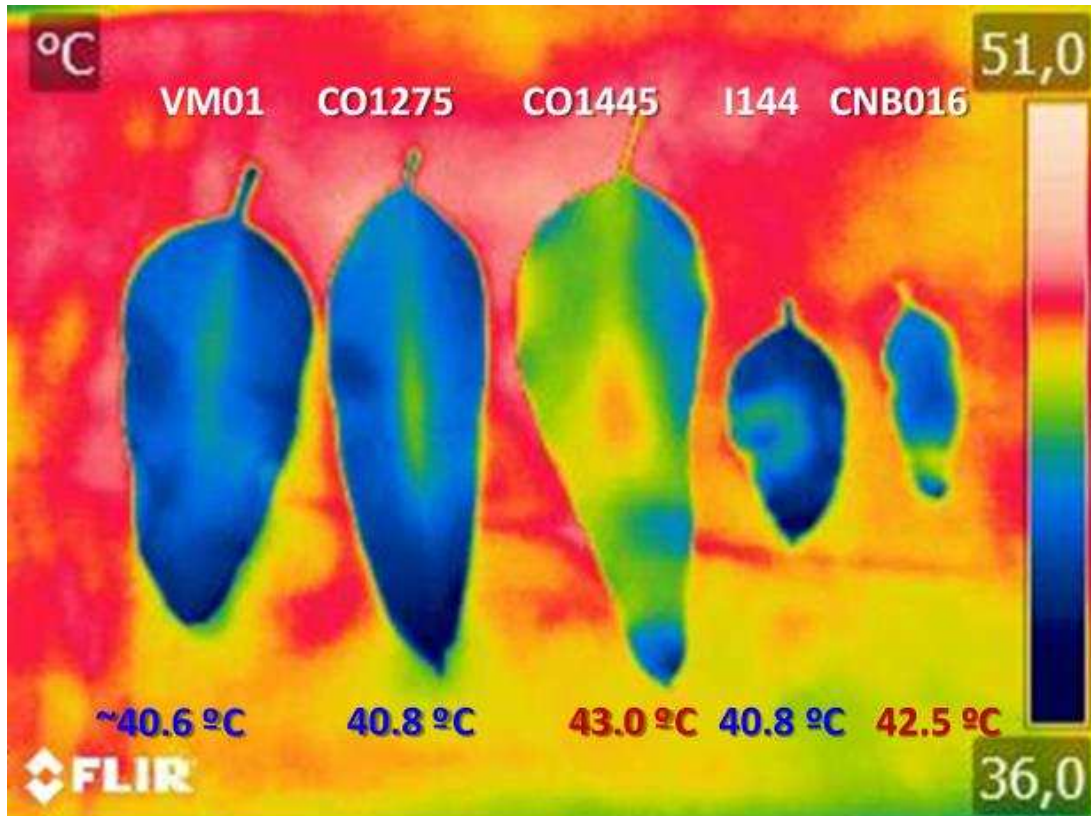


Figura 6- Temperatura foliar comparando clones sob SM (70% da CC) lado a lado. Clones tolerantes (VM01, CO1275 e CO1445) e clones sensíveis (I144 e CNB016).

3.4- Impactos metabólicos em clones de eucalipto sob seca e recuperação

A SM e SS não alteraram razão entre clorofila a/b. A manutenção dessa razão foi também evidenciada durante a recuperação (Figura 7A). O conteúdo de clorofila total foi maior em todos os clones submetidos à SS, exceto no clone VM01, quando comparados às CC. Cumpre registrar, também, que sob SS, os clones CO1275, I144 e CNB016 apresentaram maiores conteúdos totais de clorofila (Figura 7B).

Os teores de proteínas aumentaram em todos os clones sob SM, não foram diferentes sob SS e aumentaram após a RI, em comparação às CC (Figura 7C). Sob SM e SS, os clones VM01 e I144 apresentaram reduções nos teores de proteínas, em relação aos demais clones, na mesma condição. Cabe mencionar que após a RI, o clone VM01, apresentou incrementos nos teores de proteínas, superando os demais clones. Em clones submetidos a SS aumentos significativos dos aminoácidos solúveis totais foram observados. A mesma tendência de incremento desse composto foi notada também em clones submetidos à SM e após RI (Figura 7D).

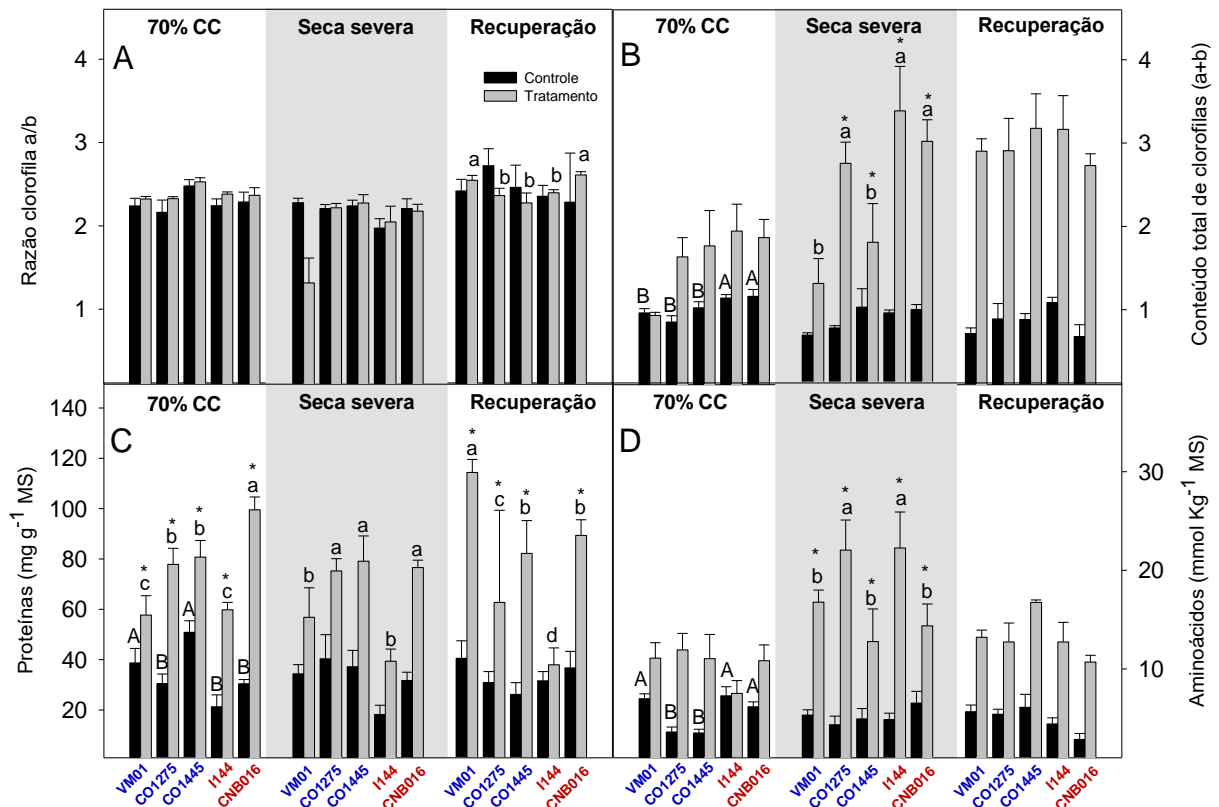


Figura 7- Teores de compostos orgânicos e de clorofilas em folhas em cinco clones de eucalipto submetidos a quatro condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% capacidade de campo (CC-contrôle), plantas sob 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada), seca severa (SS) e recuperação (RI)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: razão clorofila a/b (A), conteúdo total de clorofila (a+b) (B), proteínas solúveis totais (C) e aminoácidos totais (D). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM, SS e RI, e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e estresse de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 3 repetições biológicas.

Em relação aos açúcares solúveis, observa-se que os teores de glicose e frutose foram reduzidos em todos os clones submetidos à SM, exceto no clone I144. Em resposta à SS e após a RI não se observaram diferenças entre plantas sob diferentes teores de umidade do solo (Figura 8A-B). Não foram observadas diferenças estatísticas nos teores de sacarose entre plantas CC, SM e SS; no entanto, há uma enorme tendência a incrementos desse açúcar em plantas submetidas ao estresse (Figura 8C). Em relação aos teores de amido, não foram observadas alterações em nenhum ponto de estresse (Figura 8D).

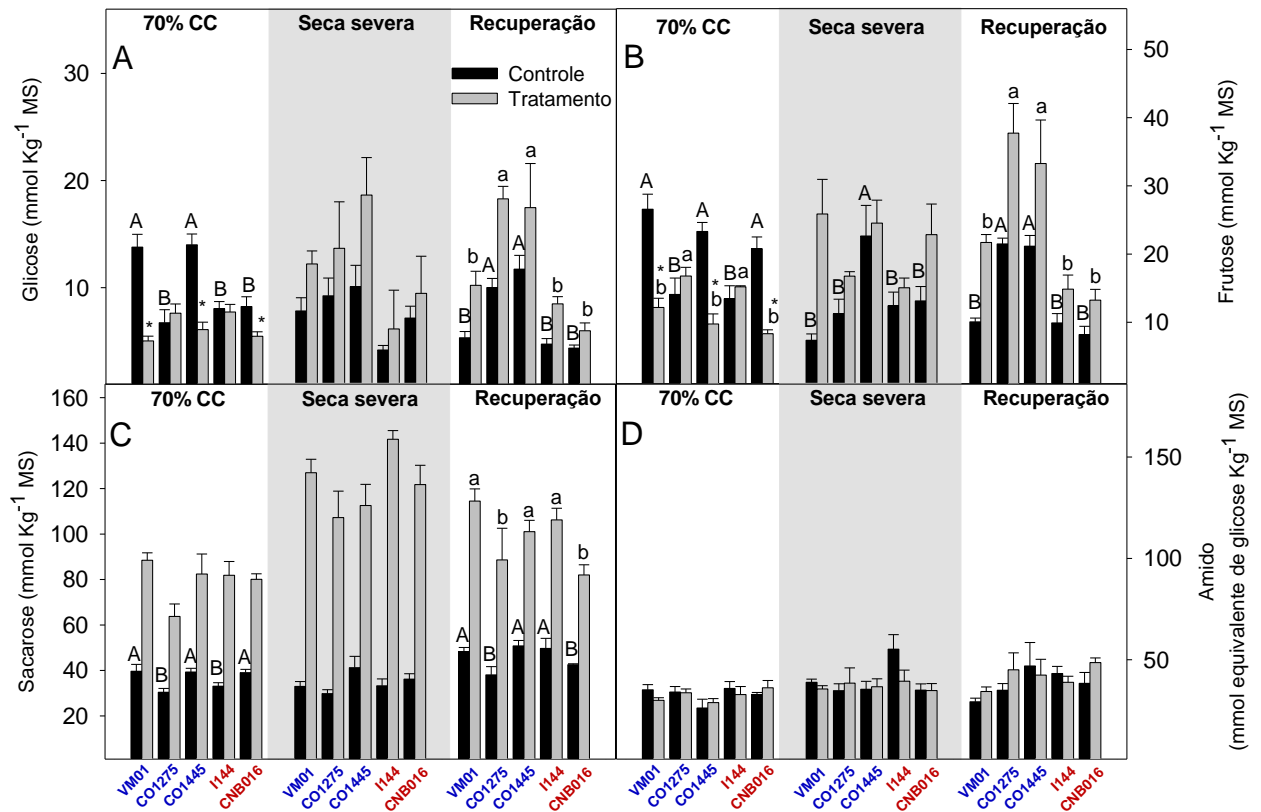


Figura 8- Teores de açúcares e amido em folhas de cinco clones de eucalipto submetidos a quatro condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% capacidade de campo (CC-controle), plantas sob 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada), seca severa (SS) e recuperação (RI)]. Foram mensurados os seguintes parâmetros: glicose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM, SS e RI e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e estresse de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 3 repetições biológicas.

Assim como ocorreu para os demais parâmetros, os dados de variáveis metabólicas também foram submetidos à PCA, onde verificou-se que os dois primeiros componentes representam 70,2% da variância total dos dados (Figura 9). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X (PC1, 53,4%) e teve a sacarose, sob seca severa, e clorofila total, durante recuperação, como as variáveis que mais contribuíram para o PC1; em adição, a glicose em plantas sob seca severa contribui para o PC2 (16,8%). Em função da contribuição das variáveis, foi observada a formação de 4 grupos distintos. De modo interessante, o primeiro grupo (amarelo) é formado por clones tolerantes em condições controle (CO1275_C e CO1445_C), o segundo (cinza) pelos demais clones também na condição controle (VM01_C, I144_C e CNB016_C). Os demais grupos foram formados por plantas em condições de seca,

sendo o terceiro grupo (verde) composto pelos clones tolerantes (VM01_S, CO1275_S e CO1445_S) enquanto que o quarto grupo (laranja) é formado por clones sensíveis (I144_S e CNB016_S).

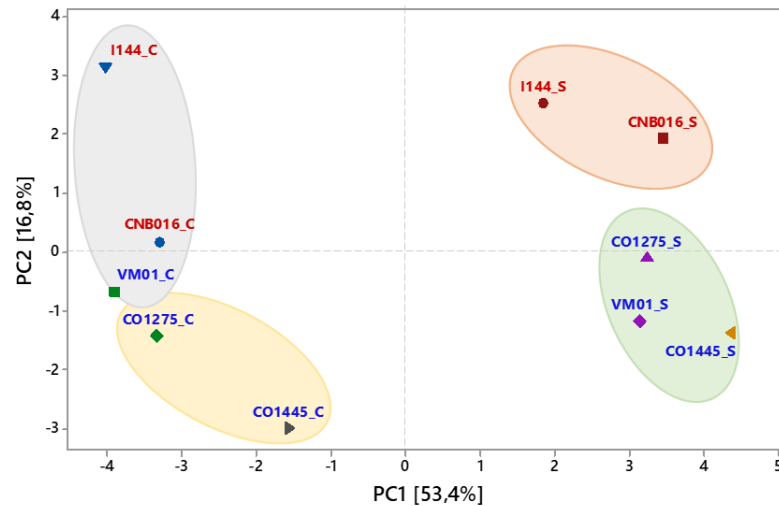


Figura 9- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados metabólicos de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em vermelho) sob CC (C) e estresse [(SM, SS e RI) (S)]. De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 4 grupos distintos. Grupo 1-amarelo: (CO1275_C e CO1445_C); Grupo 2- cinza: (VM01_C, I144_C e CNB016_C); Grupo 3-verde: (VM01_S, CO1275_S e CO1445_S); e Grupo 4-laranja: (I144_S e CNB016_S).

3.4- A deficiência hídrica moderada promove alterações morfoanatômicas

A densidade estomática foi alterada em plantas sob SM. O número de estômatos foi maior nos clones **VM01** e **I144** sob SM em comparação à CC, (Tabela 1). Os clones considerados tolerantes são anfiestomáticos (estômatos nas duas faces), ao passo que os clones sensíveis são hipoestomáticos (estômatos somente na face inferior-abaxial).

Tabela 1- Densidade estomática de cinco clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas à 100% da capacidade de campo (CC-controle) e plantas mantidas 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada)]. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores apresentam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

		Densidade estomática (n° estômato mm ⁻²)		
		Face abaxial	Face adaxial	Fase abaxial e adaxial
VM01	Controle	451,31 \pm 12,77 B	123,91 \pm 8,38 B	575,22 \pm 18,63 B
	Seca	702,72 \pm 23,91 b *	219,69 \pm 13,76 *	922,41 \pm 35,66 a *
CO1275	Controle	522,92 \pm 30,44 A	201,78 \pm 2,93 A	724,70 \pm 32,57 A
	Seca	494,52 \pm 20,10 d	201,35 \pm 9,84	695,86 \pm 28,54 c
CO1445	Controle	410,67 \pm 14,72 B	235,59 \pm 13,57 A	646,27 \pm 24,42 A
	Seca	455,48 \pm 52,96 d	220,26 \pm 18,98	675,74 \pm 53,88 c
I144	Controle	568,76 \pm 27,51 A	ND	568,76 \pm 27,51 B
	Seca	815,49 \pm 40,82 a *	ND	815,49 \pm 40,82 b *
CNB016	Controle	560,68 \pm 18,32 A	ND	560,68 \pm 18,32 B
	Seca	569,87 \pm 48,17 c	ND	569,87 \pm 48,17 d

A espessura dos tecidos foliares, mensurada, pela espessura da epiderme superior, inferior, mesofilo e total, foi alterada em plantas sob SM (Tabela 2). Tanto a epiderme superior quanto a inferior foram menores nos clones **VM01** e **CO1445** sob SM em comparação ao observado na CC. Ao se comparar clones sob SM, nota-se que o clone **CNB016** apresentou maior espessura da epiderme superior enquanto alterações na espessura da epiderme inferior não foram observadas. A espessura do mesofilo foliar (parte interna das folhas) e espessura total foi menor no clone **CO1445** e maior no clone **CNB016** sob SM em comparação à CC.

Tabela 2- Espessura dos tecidos em cinco clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e plantas mantidas à 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC e letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM, e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

		Espessura dos tecidos (μm)			
		Epiderme superior	Epiderme inferior	Mesofilo	Total
VM01	Controle	13,56 \pm 1,32	11,86 \pm 0,66 A	192,61 \pm 11,55 C	216,55 \pm 12,27 C
	Seca	10,72 \pm 0,34 b *	9,84 \pm 0,29 *	199,35 \pm 6,57	218,80 \pm 6,65
CO1275	Controle	10,96 \pm 0,41	9,55 \pm 0,27 B	185,92 \pm 9,59 C	205,23 \pm 9,66 C
	Seca	9,82 \pm 1,09 b	8,89 \pm 1,18	208,68 \pm 10,39	227,09 \pm 11,58
CO1445	Controle	12,13 \pm 0,24	12,07 \pm 0,62 A	263,61 \pm 3,73 A	286,28 \pm 3,54 A
	Seca	9,12 \pm 0,30 b *	9,48 \pm 0,27 *	219,68 \pm 13,60 *	237,19 \pm 13,53 *
I144	Controle	12,68 \pm 0,48	10,57 \pm 0,37 B	224,94 \pm 9,50 B	247,50 \pm 9,38 B
	Seca	11,10 \pm 0,93 b	9,58 \pm 0,61	212,88 \pm 7,73	232,95 \pm 8,42
CNB016	Controle	12,36 \pm 0,43	9,61 \pm 0,30 B	193,91 \pm 4,97 C	214,64 \pm 4,60 C
	Seca	13,06 \pm 0,34 a	10,24 \pm 0,30	224,36 \pm 10,44 *	246,28 \pm 11,34 *

Sob condições de SM, a AFE foi reduzida apenas no clone **VM01** em relação ao CC (Figura 10A). Ao comparar todos os clones submetidos à SM, nota-se que os clones tolerantes (**VM01**, **CO1275** e **CO1445**) apresentaram menor AFE em relação aos clones sensíveis (**I144** e **CNB016**). A porcentagem de espaço intercelular foi reduzida nos clones **VM01**, **CO1445** e **I144** em plantas submetidas à SM em comparação à CC (Figura 10B). Sob condições de SM, menor porcentagem de espaço intercelular foi observada nos clones **VM01**, **CO1275** e **CO1445** em comparação aos demais clones (clones sensíveis).

Ao se avaliar a anatomia do pecíolo verifica-se que o número de vasos do xilema foi maior somente no clone **CO1275** sob SM em comparação à CC (Figura 10C). Tanto o diâmetro quanto a área de vasos do xilema foram reduzidos nos clones **VM01** e **CO1445** em plantas submetidas à SM, quando comparadas às CC.

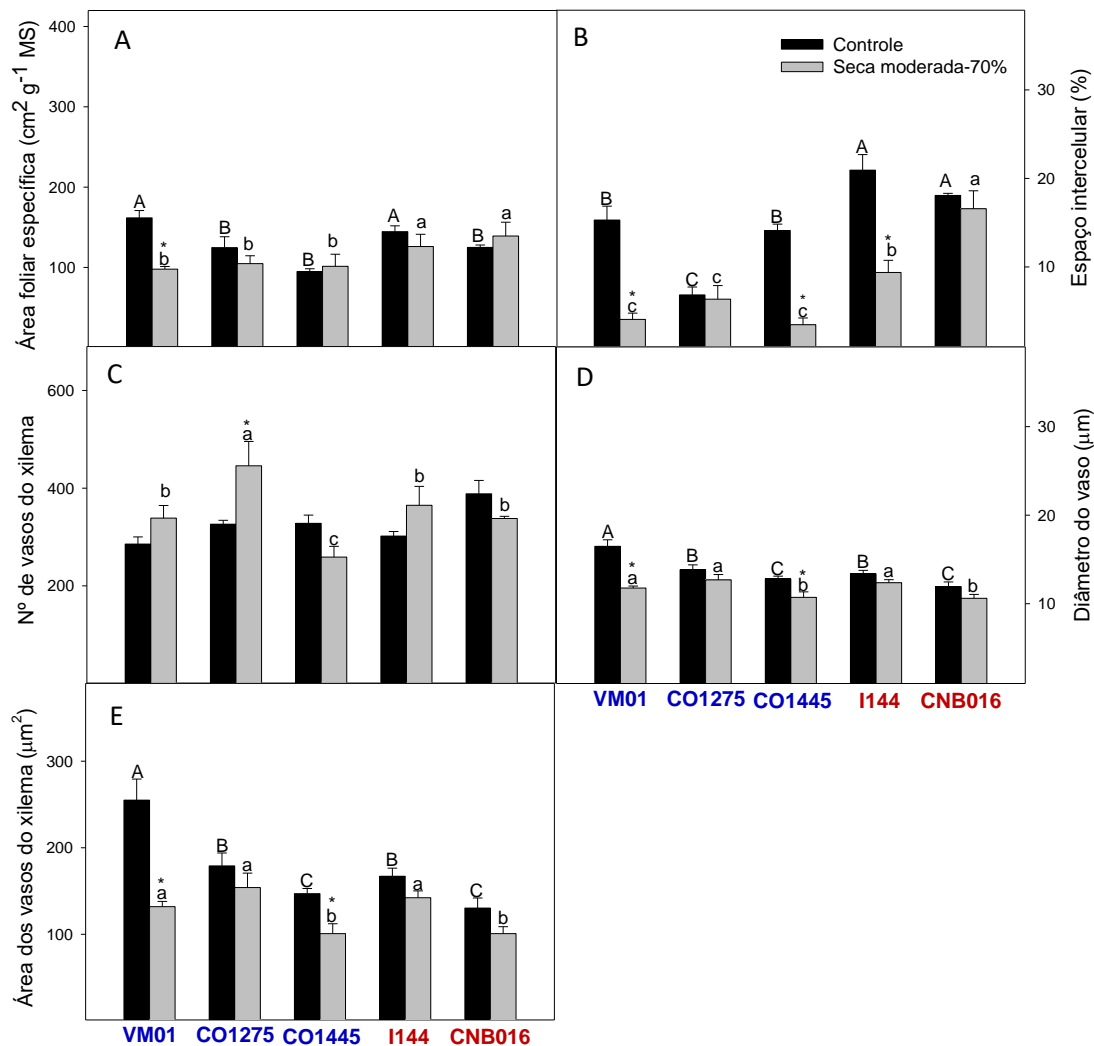


Figura 10- Parâmetros morfológicos e anatômicos de folhas e pecíolo em cinco clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo - 100% (CC) e plantas mantidas próximas a 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada)]. Foram mensurados: área foliar específica (A), porcentagem de espaço intercelular (B), nº de vasos do xilema (C), diâmetro médio de vasos do xilema (D) e área média de vasos do xilema (E). Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

Análise de PCA também foi aplicada nos dados de variáveis morfoanatômicas, onde verificou-se que os dois primeiros componentes representam 71,1% da variância total desses dados (Figura 11). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X (PC1, 41,8%) e a espessura da epiderme inferior e porcentagem de espaço intercelular foram as variáveis que mais contribuíram para o PC1, enquanto que a espessura interna do mesofilo em seca moderada (70% da CC) contribui para o PC2 (16,8%). Em função da contribuição das variáveis, foi observada a formação de 7

grupos bem distintos. Grupo 1- amarelo escuro (CO1445_S); grupo 2-verde (VM01_S); grupo 3- cinza (I144_S); grupo 4- laranja: (CO1275_C e CO1275_S); grupo 5- verde claro (VM01_C); grupo 6- amarelo claro (CNB016_C e CNB016_S); e grupo 7- azul (I1144_C e CO1445_C).

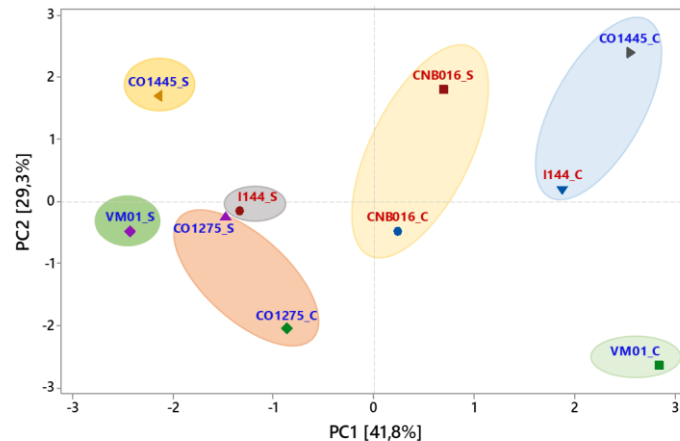


Figura 11- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados morfoanatômicos de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em Vermelho) sob CC (C) e SM (S). De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 7 grupos bem distintos, sendo eles: Grupo 1-amarelo escuro (CO1445_S); Grupo 2-verde (VM01_S); Grupo 3- cinza (I144_S); Grupo 4-laranja (CO1275_C e CO1275_S); Grupo 5-verde claro (VM01_C); Grupo 6-amarelo claro (CNB016_C e CNB016_S); e Grupo 7-azul (I1144_C e CO1445_C).

3.5- Avaliação nutricional de plantas sob déficit hídrico

3.5.1- Teor nutricional de folhas submetidas à SM

Em folhas dos clones submetidos à SM, os teores de cálcio, magnésio, cobre e zinco foram alterados em comparação às CC (Tabela 3). Assim, os teores de cálcio aumentaram nos clones VM01 e CNB016 ao passo que os teores de magnésio foram maiores nos clones VM01, CO1275 e I144; os teores de cobre apresentaram incrementos nos clones I144 e CNB016 e, por fim, os teores de zinco foram elevados nos clones CO1445, I144 e CNB016.

Tabela 3- Teor nutricional foliar de folhas de cinco clones de eucalipto submetidos a duas condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle) e plantas mantidas próximas a 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada)]. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob SM e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e SM de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

Seca moderada (70 % da CC)						
Folhas						
		Teor de Ca (g Kg ⁻¹)	Teor de Mg (g Kg ⁻¹)	Teor de K (g Kg ⁻¹)	Teor de Cu (mg Kg ⁻¹)	Teor de Zn (mg Kg ⁻¹)
VM01	Controle	6,47 \pm 0,36 A	1.01 \pm 0.04 A	10,69 \pm 0,57	34,86 \pm 3,00	412,83 \pm 30,70 B
	Seca	8,46 \pm 0,58 a*	0.76 \pm 0.02 *	13,65 \pm 0,50	27,53 \pm 2,45	409,11 \pm 21,65
CO1275	Controle	5,63 \pm 0,64 A	0.70 \pm 0.05 C	9,88 \pm 0,86	36,19 \pm 6,19	323,73 \pm 36,50 B
	Seca	6,36 \pm 0,56 b	0.71 \pm 0.05	11,21 \pm 1,39	29,76 \pm 2,79	367,60 \pm 33,88
CO1445	Controle	6,69 \pm 0,33 A	0.65 \pm 0.02 C	7,71 \pm 0,37	30,77 \pm 3,21	633,01 \pm 47,30 A
	Seca	5,81 \pm 0,56 b	0.70 \pm 0.04	10,92 \pm 1,11	26,52 \pm 0,80	409,50 \pm 24,40 *
I144	Controle	5,29 \pm 0,28 A	0.94 \pm 0.07 A	11,01 \pm 0,66	34,35 \pm 2,02	326,81 \pm 47,86 B
	Seca	6,32 \pm 0,61 b	0.78 \pm 0.03 *	13,28 \pm 1,81	48,31 \pm 8,13	471,91 \pm 67,10 *
CNB016	Controle	3,82 \pm 0,12 B	0.81 \pm 0.05 B	9,44 \pm 0,56	22,76 \pm 1,71	225,84 \pm 37,11 B
	Seca	5,41 \pm 0,48 b*	0.67 \pm 0.03 *	16,32 \pm 1,14	40,51 \pm 2,45	520,76 \pm 45,77 *

3.5.2- Teor nutricional de folhas, ramos e raízes após reidratação (RI)

A RI dos clones previamente submetidos à SM e SS promoveu alterações dos teores nutricionais em folhas, ramos e raiz (Tabela 4). Assim, observa-se que em folhas dos clones **VM01** e **I144**, os teores de cálcio incrementaram, enquanto reduções foram observadas em plantas do clone **CO1275** RI quando comparadas às CC. O teor de magnésio foi reduzido em ramos de todos os clones avaliados após a RI, excetuando-se o clone **CNB016**. Em todos os clones reidratados os teores de potássio foram incrementados tanto em folhas quanto em ramos. Foram observados incrementos nos teores de cobre em folhas de todos os clones RI comparados às CC. Não foram observadas diferenças nos teores de zinco em nenhum dos órgãos avaliados.

Tabela 4- Teor nutricional em folhas em cinco clones de eucalipto submetidos a quatro condições de umidade do solo [(plantas próximas a 100% da capacidade de campo (CC-controle), ((plantas mantidas à 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada), seca severa (SS) e recuperação (RI))]. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob CC, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob RI e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre CC e RI de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Valores representam média \pm EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

Reidratação (RI)						
FOLHAS		Teor de Ca (g Kg ⁻¹)	Teor de Mg (g Kg ⁻¹)	Teor de K (g Kg ⁻¹)	Teor de Cu (mg Kg ⁻¹)	Teor de Zn (mg Kg ⁻¹)
VM01	Controle	6,78 \pm 0,51 A	1,26 \pm 0,07	9,20 \pm 0,21	23,52 \pm 1,43	502,98 \pm 41,91
	Seca	8,05 \pm 0,46 a*	0,77 \pm 0,03	26,78 \pm 0,75 a*	58,53 \pm 3,79	644,37 \pm 27,00
CO1275	Controle	5,75 \pm 0,87 A	1,09 \pm 0,10	7,66 \pm 0,22	33,27 \pm 5,46	268,70 \pm 26,07
	Seca	3,93 \pm 0,80 b*	0,59 \pm 0,07	15,08 \pm 2,40 d*	54,16 \pm 16,07	446,01 \pm 74,36
CO1445	Controle	4,79 \pm 0,28 B	0,78 \pm 0,05	5,84 \pm 0,044	27,22 \pm 5,60	357,08 \pm 11,67
	Seca	5,36 \pm 0,52 b	0,52 \pm 0,05	18,76 \pm 2,17 c*	46,98 \pm 5,23	473,92 \pm 43,08
I144	Controle	5,24 \pm 0,30 B	1,17 \pm 0,05	8,79 \pm 0,10	30,35 \pm 3,08	322,37 \pm 29,53
	Seca	9,30 \pm 0,51 a*	0,88 \pm 0,07	23,73 \pm 0,78 b*	83,97 \pm 12,03	581,36 \pm 48,08
CNB016	Controle	4,09 \pm 0,21 B	0,95 \pm 0,09	7,77 \pm 0,32	18,88 \pm 1,03	209,74 \pm 9,19
	Seca	5,22 \pm 0,23 b	0,68 \pm 0,07		51,92 \pm 5,03	463,58 \pm 43,39
RAMOS		Teor de Ca (g Kg ⁻¹)	Teor de Mg (g Kg ⁻¹)	Teor de K (g Kg ⁻¹)	Teor de Cu (mg Kg ⁻¹)	Teor de Zn (mg Kg ⁻¹)
VM01	Controle	7,42 \pm 0,45	0,47 \pm 0,01 A	6,27 \pm 0,40	33,16 \pm 2,16	538,91 \pm 39,86 A
	Seca	9,40 \pm 0,84 b	0,26 \pm 0,00 b*	12,70 \pm 0,55 a*	42,90 \pm 2,64 b	600,07 \pm 44,75 a
CO1275	Controle	8,89 \pm 1,17	0,40 \pm 0,03 B	6,24 \pm 0,78	25,00 \pm 2,34	305,83 \pm 38,63 C
	Seca	9,00 \pm 0,91 b	0,19 \pm 0,01 c*	8,35 \pm 0,45 c*	34,02 \pm 2,59 b	397,85 \pm 26,54 b
CO1445	Controle	7,22 \pm 0,51	0,39 \pm 0,02 B	5,89 \pm 0,61	34,09 \pm 3,69	433,86 \pm 30,44 B
	Seca	9,28 \pm 0,68 b	0,19 \pm 0,02 c*	9,35 \pm 1,20 c*	49,55 \pm 4,86 a	474,10 \pm 47,87 b
I144	Controle	10,27 \pm 1,19	0,52 \pm 0,03 A	7,50 \pm 0,62	31,48 \pm 1,94	359,15 \pm 30,38 C
	Seca	15,12 \pm 1,56 a	0,35 \pm 0,03 a*	10,47 \pm 0,57 b*	50,66 \pm 2,41 a	545,68 \pm 57,73 a
CNB016	Controle	6,73 \pm 0,45	0,40 \pm 0,02 B	6,21 \pm 0,43	27,93 \pm 1,92	406,91 \pm 38,53 B
	Seca	10,88 \pm 1,17 b	0,34 \pm 0,01 a	11,16 \pm 0,44 b*	38,67 \pm 3,14 b	594,12 \pm 35,84 a
RAIZ		Teor de Ca (g Kg ⁻¹)	Teor de Mg (g Kg ⁻¹)	Teor de K (g Kg ⁻¹)	Teor de Cu (mg Kg ⁻¹)	Teor de Zn (mg Kg ⁻¹)
VM01	Controle	3,20 \pm 0,15	0,34 \pm 0,02	2,55 \pm 0,20	40,18 \pm 3,41	665,61 \pm 46,25
	Seca	5,07 \pm 0,28	0,35 \pm 0,02	3,43 \pm 0,23 B	71,76 \pm 6,90	1341,67 \pm 177,50
CO1275	Controle	4,53 \pm 0,45	0,56 \pm 0,08	3,14 \pm 0,18	42,29 \pm 3,55	606,37 \pm 72,37
	Seca	6,15 \pm 0,21	0,49 \pm 0,05	6,15 \pm 0,70 A	73,60 \pm 6,74	769,68 \pm 99,48
CO1445	Controle	3,31 \pm 0,24	0,26 \pm 0,04	3,66 \pm 0,35	36,34 \pm 2,10	371,55 \pm 46,97
	Seca	5,52 \pm 0,24	0,77 \pm 0,22	5,09 \pm 0,93 A	65,43 \pm 2,58	716,35 \pm 37,63
I144	Controle	3,54 \pm 0,24	0,51 \pm 0,06	2,85 \pm 0,20 B	63,81 \pm 6,41	819,18 \pm 119,86
	Seca	6,42 \pm 0,79	0,46 \pm 0,05	4,29 \pm 0,94	64,91 \pm 6,22	840,29 \pm 75,56
CNB016	Controle	3,55 \pm 0,20	0,53 \pm 0,05	3,50 \pm 0,11 A	46,39 \pm 3,80	893,93 \pm 79,40
	Seca	4,90 \pm 0,21	0,88 \pm 0,11	5,35 \pm 0,25	111,01 \pm 16,14	2025,20 \pm 349,00

Foi possível verificar, mediante PCA das variáveis nutricionais, que os dois primeiros componentes representam 64,8% da variância total dos dados (Figura 12). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X, PC1 (43,0%) e os teores de cobre e zinco em folhas após a recuperação foram os que mais contribuíram para o PC1, enquanto que o teor de magnésio na raiz após a recuperação contribui para o PC2 (21,8%). Baseado na contribuição das variáveis, a formação de seis grupos bem distintos foi observada. Grupo 1- verde claro (CO1445_C e VM01_C); grupo 2- azul (VM01_S e I144_S); grupo 3- amarelo claro (I144_C e CO1275_C); grupo 4- cinza (CO1445_S e CO1275_S); grupo 5- verde escuro (CNB016_C); e grupo 6- amarelo escuro (CNB016_S).

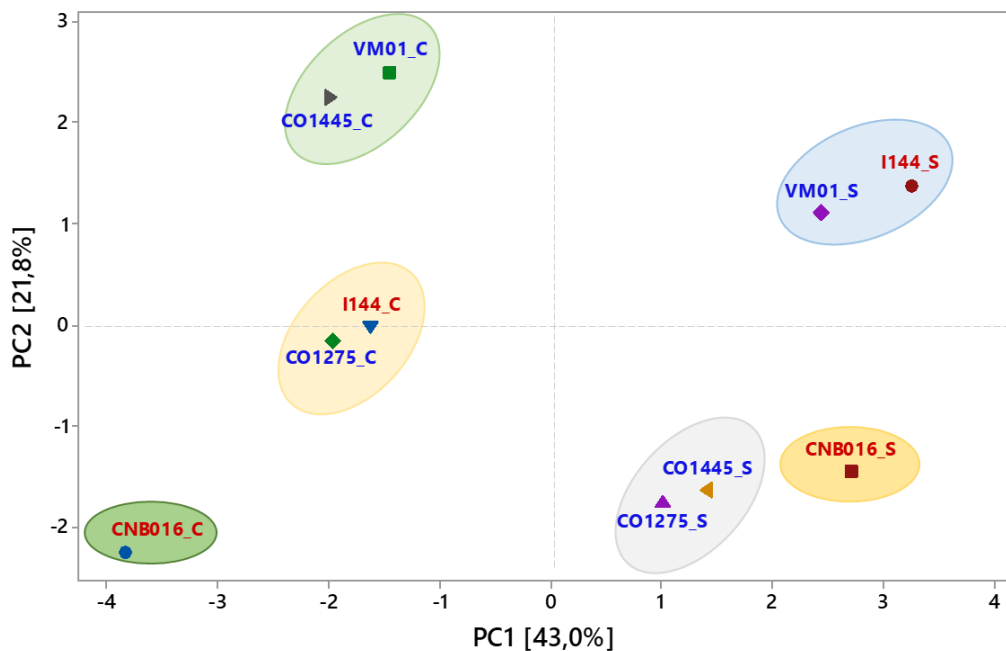


Figura 12- Análise de componentes principais (PCA) baseado nos dados nutricionais de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em vermelho) sob CC (C) e estresse [(SM e RI) (S)]. De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 6 grupos bem distintos, sendo eles: Grupo 1- verde claro: (CO1445_C e VM01_C); Grupo 2- azul: (VM01_S e I144_S); Grupo 3- amarelo claro: (I144_C e CO1275_C); Grupo 4- cinza: (CO1445_S e CO1275_S); Grupo 5- verde escuro (CNB016_C); e Grupo 6- amarelo escuro (CNB016_S).

Considerando todas as variáveis obtidas neste trabalho, 65 delas foram utilizadas para uma PCA global, onde verificou-se que os dois primeiros componentes representam 69,4% da variância total dos dados (Figura 13). As maiores variações foram observadas ao longo do eixo X (PC1, 50,8%) e, a g_s e E sob SM e clorofilas

totais após a RI foram as variáveis que mais contribuíram para o PC1, enquanto que o conteúdo de amido sob SM e a densidade estomática da face adaxial contribuíram para o PC2 (18,6%). De acordo com a contribuição individual dessas variáveis, foi observada a formação de 4 grupos baseados nos níveis de tolerância (clones tolerantes e sensíveis) e na presença e ausência de estresse, sendo eles: grupo 1 (azul) formado por clones tolerantes sob condições controle (VM01_C, CO1275_C e CO1445_C), grupo 2 (laranja) formado por clones sensíveis sob condições controle (I144_C e CNB016_C), grupo 3 (amarelo) composto por clones tolerantes sob estresse (VM01_S, CO1275_S e CO1445_S) e grupo 4 (verde) formado por clones sensíveis sob estresse (I144_S e CNB016_S).

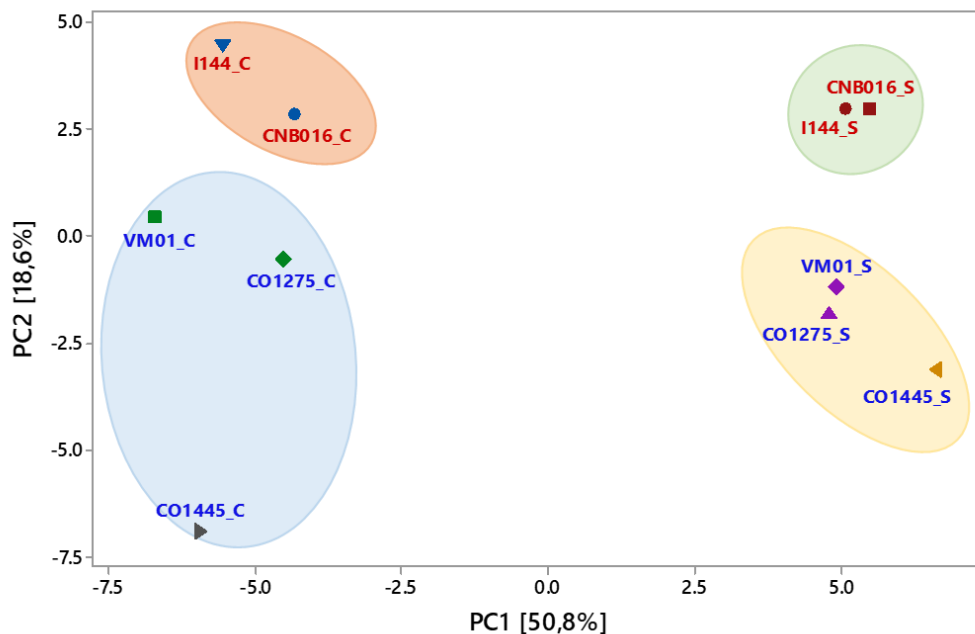


Figura 13- Análise de componentes principais (PCA) baseado em 65 variáveis avaliadas de clones de eucalipto tolerantes (clones em azul) e clones sensíveis (clones em vermelho) sob CC (C) e estresse [(SM, SS e RI) (S)]. De acordo com a contribuição das variáveis, foi observada a formação de 4 grupos de acordo com os níveis de tolerância. Grupo 1-azul: VM01_C, CO1275_C e CO1445_C; Grupo 2-laranja: I144_C, e CNB016_C; Grupo 3-amarelo: VM01_S, CO1275_S e CO1445_S; e Grupo 4-verde: I144_S e CNB016_S.

4- DISCUSSÃO

Embora a altura e diâmetro final não apresentem diferenças entre plantas cultivadas sob CC e com limitada disponibilidade hídrica, nota-se que, sob estresse, os clones CO1275 e CO1445 apresentam maior altura em relação aos demais clones (Figura 1A-B). Por outro lado, a biomassa dos diferentes órgãos apresentou reduções

em todos os clones sem um padrão definido no que se refere à tolerância dos clones avaliados. Reduções em biomassa foram também observadas em clones de *E. camaldulensis* submetidos à deficiência hídrica (Utkhao & Yingjajaval, 2015). É plausível sugerir que, em função da imposição de uma seca severa, todos os materiais ora utilizados tenham sofrido muito ao final da mesma; entretanto, com a retomada da irrigação maior investimento em biomassa, principalmente foliar pode possibilitar um maior crescimento desses materiais.

Um controle estomático preciso é necessário para que as plantas possam lidar com situações de limitação hídrica (Ruíz et al., 2015). Neste trabalho, as trocas gasosas em clones de eucalipto cultivados sob deficiência hídrica foram significativamente afetadas (Figura 4). Reduções em g_s e E em todos os clones sob SM, decréscimos em C_i nos clones VM01, CO1275, CO1445 e I144 e tendência a redução em A_N foram observados, sugerindo a ocorrência de possíveis limitações difusivas em resposta à limitação hídrica. Resultados semelhantes foram obtidos em *E. globulus* (Correia et al., 2018) e três espécies de angiospermas quando cultivadas sob seca (Creek et al., 2018). Registre-se, que, o clone CNB016 sob seca apresentou valores de C_i semelhantes aos observados em plantas controle indicando, além da limitação difusiva, a ocorrência de possíveis limitações bioquímicas nesse material.

Declínios na transpiração, usualmente observados em plantas sob déficit hídrico, podem culminar em incrementos na temperatura foliar (Costa et al., 2013). Assim, a temperatura das folhas foi avaliada utilizando-se uma câmera com sensor térmico por infravermelho, o que nos permitiu inferir sobre os processos de dissipação de energia (Figura 6). Tendo em mente que a g_s foi reduzida em todos os clones avaliados em condições de seca e que superfícies mais frias indicam melhor dissipação energética, foi possível notar que os clones tolerantes (VM01 e CO1275) e o clone sensível (I144) apresentaram uma maior capacidade de refrigeração foliar, mantendo a superfície foliar mais com menores temperaturas mesmo quando sob SM. Em consonância, essas plantas apresentaram maiores taxas transpiratórias. De modo similar, genótipos de lentilha (*Lens culinaris*) considerados tolerantes à seca apresentaram temperatura do dossel mais fria quando comparados àqueles genótipos considerados sensíveis (Biju et al., 2018). Tais resultados, em conjunto com os dados de trocas gasosas aqui descritos, indicam que a temperatura foliar, mensurada em

câmeras fotográficas acopladas à um sensor térmico por infravermelho, apresenta-se como um adequado indicador da tolerância à seca em clones de eucalipto.

A RI das plantas permitiu a recuperação das trocas gasosas que, apresentaram ainda tendências de superioridade em relação às plantas que não passaram pelo estresse (Figura 4). Coletivamente, tais resultados indicam que os clones de eucalipto utilizados apresentam adequada plasticidade fenotípica. Por outro lado, clones de *E. globulus* não apresentaram recuperação das trocas gasosas mesmo após 3 dias de reidratação (Correia et al., 2018). Em adição, mesmo após 10 dias de reirrigação, a A_N em *E. pauciflora* apresentou valores similares ao controle, ao passo que g_s e E mantiveram-se reduzidos (Martorell et al., 2013). Reduções em J_{flu} em clones submetidos à SM com posterior incrementos em plantas RI, em comparação às CC, foram também observados. Essa recuperação, alcançando valores similares aos controles e tendência a incrementos em plantas reidratadas, indica que tais clones apresentam alta eficiência na transferência de elétrons entre os fotossistemas, refletindo em melhoras no desempenho fotossintético desses materiais. Destaca-se, ainda, que, tendências de aumento em A_N podem estar relacionadas, ao menos parcialmente, ao aumento dos drenos com a retomada do crescimento, devido a maior demanda por fotoassimilados, refletindo em aumentos em A_N .

Alterações metabólicas em plantas submetidas a diferentes teores de umidade do solo (SM e SS) e RI foram também evidenciados em nosso trabalho. Neste contexto, os teores de aminoácidos aumentaram em plantas submetidas à SS, sem alteração nos teores de proteínas, ao passo que, sob SM e RI, os aminoácidos não diferiram em relação aos teores observados em CC. Entretanto, os teores de proteínas apresentaram incrementos nessas duas condições (SM e RI) (Figura 7). Elevados teores de aminoácidos acompanhados por incrementos de proteínas parecem indicar ajustes na osmoproteção sem a degradação de proteínas para sustentar a síntese de aminoácidos (Medeiros, et al., 2013), entretanto, aminoácidos como de cadeia ramificada, podem auxiliar na tolerância à seca como observado em *Arabidopsis thaliana* (Pires et al., 2016). Dessa forma, a manutenção e mesmo aumentos nos teores de aminoácidos e proteínas, como aqui observados, podem ter, em última instância, uma função osmoprotetora em resposta à seca.

Incrementos em sacarose em plantas submetidas à SM, como notados aqui (Figura 8), favorecem, ao menos parcialmente, o crescimento da planta após a

remoção do estresse (Merchant et al., 2006). Neste contexto, aumentos nos teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) notadas em SM e SS, com posterior recuperação após a RI, podem estar associadas à uma estratégia mais protetora no que respeita ao potencial de recuperação do crescimento em clones de eucalipto.

Adequado controle estomático pode ser inferido através da densidade estomática, com vistas a evitar perdas excessivas de água, particularmente em resposta a condições de estresse (Tabela 1). Clones tolerantes (VM01, CO1275 e CO1445) apresentaram estômatos nas duas faces (anfiestomáticos), característica essa que está potencialmente associada a maior difusão de CO₂ (Mott et al., 1982) e confere vantagens em ambientes com limitação hídrica. Em conjunto com a densidade estomática, modificações na AFE, espessura dos tecidos e espaços intercelulares, como observados em clones cultivados sob seca moderada, parecem ser um importante mecanismo em eucaliptos para lidar com o déficit hídrico. Reduções na AFE evidenciadas em clones ditos tolerantes sob seca estão, aparentemente, associadas à espessura e adensamento dos tecidos foliares (Figura 10). Alterações mais visíveis foram notadas nos clones tolerantes destacando-se VM01 e CO1445. O clone CO1445 sofreu reduções na espessura das epidermes superior e inferior, espessura do mesofilo e total (Tabela 2), associadas a reduções do espaço intercelular indicando a presença de células menores, porém em maior número. Redução na espessura foliar associadas, em larga escala, a redução de espaços intercelulares foi também notada em híbridos de *Trandescantia*, estratégia essa que pode, todavia, comprometer a difusão de gases no tecido (Alves et al., 2001). De modo oposto, no clone CNB016 observaram-se aumentos na espessura do mesofilo e espessura total acoplados a maior porcentagem de espaço intercelular, que podem indicar a presença de folhas mais espessas, porém com pouca massa. Tais aspectos morfoanatômicos, associados à segurança hidráulica da planta, são, portanto, essenciais que para plantas sejam capazes de tolerar a limitação hídrica. Neste contexto, o investimento em maior número de vasos, porém de menor calibre, reduzem riscos de entrada de ar no xilema (Bauerle et al., 2011). Com efeito, os clones VM01 e CO1445, que apresentaram reduções tanto no diâmetro quanto na área dos vasos do xilema, encontram-se, em consonância com a escala de tolerância definida pelas empresas do ramo florestal, como realmente mais tolerantes à limitada disponibilidade hídrica.

A importância do Ca, no que respeita os efeitos nutricionais observados em plantas sob seca, foi também demonstrada aqui (Tabelas 3 e 4). Salienta-se que esse elemento exerce função estrutural em vegetais, atuando na síntese de parede celular (Nutrição de plantas, 2004). Em adição, diversos estudos relatam que o Ca pode reduzir, e até mesmo retardar, os impactos oxidativos decorrentes da limitação hídrica (Ahanger et al., 2016). Sob SM, clones como VM01 e CNB016 apresentaram incrementos de Ca o que pode estar contribuindo, ao menos em parte, para a maior tolerância desses materiais. Cabe mencionar também que o magnésio, importante constituinte da clorofila e ativador de inúmeras enzimas (Nutrição de Plantas, 2004), foi maior nos clones VM01 e I144 indicando que este elemento possa também auxiliar na A_N corroborando com os dados de trocas gasosas.

5- CONCLUSÕES

- A seca prolongada desencadeia mecanismos associados com a tolerância à seca como observado pela plasticidade fenotípica de materiais genéticos como o clone VM01;
- Bioindicadores previamente selecionados no capítulo I demonstram seu grande potencial para utilização em condições de campo;
- A anatomia foliar, termografia e densidade estomática permitiram distinguir, de modo adequado, materiais genéticos tolerantes e sensíveis;
- A análise de componentes principais (PCA) global permitiu a separação inequívoca dos clones tolerantes e sensíveis sob condições controle e de estresse;
- Trabalhos em campo permitirão avaliar não só o desempenho de plantas de eucalipto cultivados em locais com baixa disponibilidade hídrica, como também possibilitará a verificação de ajustes decorrentes do potencial genético aliado às condições ambientais.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJA (2001) Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição área urbana. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, V.24, n.4 (suplemento), p.567-576.

Amrutha S, Parveen ABM, Muthupandi M, Sivakumar V, Nautiyal R, Dasgupta MG (2019) Variation in morpho-physiological, biochemical and molecular responses of two *Eucalyptus* species under short-term water stress. *Acta Botanica Croatica* 78: 125-134.

Bauerle TL, Centinari M, Bauerle WL (2011) Shifts in xylem vessel diameter and embolisms in grafted apple trees of differing rootstock growth potential in response to drought. *Planta* 234:1045–1054.

Biju S, Fuentes S, Gupta D (2018) The use of infrared thermal imaging as a non-destructive screening tool for identifying drought-tolerant lentil genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 11-24.

Boer HJde, Drake PL, Wendt E, Price CA, Schulze ED, Turner NC, Nicolle D, Veneklaass EJ (2016) Apparent overinvestment in leaf venation relaxes leaf morphological constraints on photosynthesis in Arid Habitats. *Plant Physiology* 172: 2286-2299.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

Cheng J, Chu P, Chen D, Bai Y, Niu S (2016) Functional correlations between specific leaf area and specific root length along a regional environmental gradient in Inner Mongolia grasslands. *Functional Ecology* 30: 985–997.

Correia B, Hancock RD, Amaral J, Gomez-Cadenas A, Valledor L, Pinto G (2018) Combined drought and heat activates protective responses in *Eucalyptus globulus* That are not activated when subjected to drought or heat stress alone. *Frontiers in Plant Science* 9: 819.

Correia B, Hancock RD, Valledor L, Pinto G (2018) Gene expression analysis in *Eucalyptus globulus* exposed to drought stress in a controlled and a field environment indicates different strategies for short- and longer-term acclimation. *Tree Physiology* 38: 1623-1639.

Correia B, Pintó-Marijuan M, Neves L, Brossa R, Dias MC, Costa A, Castro BB, Araújo C, Santos C, Chaves MM, Pinto G (2013) Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum* 150: 580-592.

Coscolin, RBS, Broetto F, Marchese JA, Campohermoso MC, Paladini MV (2011) Effects of hydric deficiency on gas exchange parameters and metabolism of *Eucalyptus grandis* clones. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 23 (4): 255-262.

Costa JM, Grant OM, Chaves MM (2013) Thermography to explore plant– environment interactions. *Journal of Experimental Botany* 64: 3937-3949.

Creek D, Blackman CJ, Brodribb TJ, Choat B, Tissue DT (2018) Coordination between leaf, stem, and root hydraulics and gas exchange in three arid-zone angiosperms during severe drought and recovery. *Plant, Cell & Environment* 48: 2869-2881.

Das A, Rushton P, Rohila J (2017) Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. *Plants* 6: 21.

Diário do comércio. Disponível em: <http://diariodocomercio.com.br/sitenovo/silvicultura-perde-cerca-de-150-milhectares-com-a-seca/>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

Eremina M, Rozhon W, Poppenberger B (2016) Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 797–810.

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.

Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2013) Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions. *Plant Cell Reports* 32: 1007–1016.

Gomes LML. Características morfofisiológicas associadas à restrição hídrica em clones de eucalipto. 37 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

Granda V, Delatorre C, Cuesta C, Centeno ML, Fernández B, Rodríguez A, Feito I (2014) Physiological and biochemical responses to severe drought stress of nine *Eucalyptus globulus* clones: a multivariate approach. *Tree Physiology* 34: 778-786.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387-396.

Martorell S, Diaz-Espejo A, Medrano H, Ball MC, Choat B (2013) Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas Exchange. *Plant, Cell & Environment* 37: 617-626.

Medeiros DB, Silva EC, Nogueira, RJMC, Teixeira MM, Buckeridge MS (2013) Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(3): 213-222.

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. *Plant, Cell and Environment* 29, 2017–2029.

Mitchell PJ, McAdam SAM, Pinkard EA, Brodribb TJ (2017) Significant contribution from foliage-derived ABA in regulating gas exchange in *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 37: 236-245.

Mott KA, Gibson AC, O'leary JW (1982) The adaptive significance of amphistomatic leaves. *Plant, Cell and Environment* 5, 455-460.

Müller C, Hodecker BER, Merchant A, Barros NF (2017) Nutritional efficiency of eucalyptus clones under water stress. *Rev Bras Cienc Solo* 41:e0160528.

Nutrição de plantas (2004). Disponível em: <http://www.nutricaoodeplantas.agr.br/site/>. Acesso em: 15 de janeiro 2021.

Otto MSG, Francisco JG, Gonzalez BT, Calvo LA, Mattos EM, Almeida M, Moral RA, Demétrio CGB, Stape JL & Oliveira RF (2017) Changes in γ -aminobutyric acid concentration, gas exchange, and leaf anatomy in Eucalyptus clones under drought stress and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 208.

Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB, Daloso DM, Pham PA, Barros KA, Engqvist MK, Florian A, Krahnert I, Maurino VG, Araújo WL, Fernie AR (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environment* 39:1304–1319.

Poorter H, Niinemets U, Poorter L, Wright IJ, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182: 565–588.

Ruíz M, Quemada M, García RM, Carrillo JM, Benavente E (2015) Use of thermographic imaging to screen for drought-tolerant genotypes in *Brachypodium distachyon*. *Crop & Pasture Science* 67: 99-108.

Utkhao W & Yingjajaval S (2015) Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. *Trees* 29: 1581-1592.

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

Yemm EW & Cocking EC (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst* 80: 948.

CAPÍTULO III

MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À SECA DE PROGÊNIES EM CAMPO

1- INTRODUÇÃO

Devido à crescente demanda por produtos florestais vários, a expansão das plantações no Brasil com eucalipto, árvore de rápido crescimento e com alto potencial de sequestro de carbono, tem sido direcionada para áreas onde há restrições de água e nutrientes, levando a reduções significativas na produtividade ou alta mortalidade de árvores. De modo particular, os impactos da deficiência hídrica em plantios florestais têm sido intensamente investigados, principalmente, no que se refere ao desempenho adequado de plantas de eucalipto cultivadas sob condições adversas. Neste contexto, os impactos da limitação hídrica são, usualmente, focados em respostas associadas às aclimações fisiológicas ou morfológicas embora pouco, ou nada, se sabe acerca da interação entre esses fatores (Susiluoto & Berninger, 2007).

Cabe mencionar que a grande maioria dos estudos buscando compreender as respostas vegetais à seca são realizados em plantas jovens e submetidas ao estresse de curto prazo, o que, provavelmente, não reflete a realidade observada em campo, usualmente caracterizada por secas prolongadas e recorrentes (Pritzkow, et al., 2020). Ao se avaliar, ao longo dos anos, a plasticidade em eucalipto, estes mesmos autores observaram que mudanças morfológicas estariam mais associadas às secas mais severas, ao passo que características fisiológicas puderam ser observadas sob seca moderada. Registre-se que a aclimação de plantas a um determinado ambiente é, usualmente, bastante complexa e envolve interações entre potencial genético x ambiente (Amrutha, et al., 2021).

Os desafios para a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são vários e, assim, algumas estratégias utilizadas pelas plantas para lidar com a limitação hídrica são, frequentemente, observadas. Neste contexto, uma das primeiras estratégias utilizadas pelas plantas sob condições de seca é a redução da área foliar promovendo, simultaneamente a redução da superfície transpiracional (Carignato et al., 2019). Em paralelo, a área foliar específica (relação entre área e massa foliar) está também relacionada à tolerância à seca, uma vez que permite inferir sobre a

distribuição da biomassa foliar indicando a espessura da folha (Carignato et al., 2019). Com efeito, alterações na área foliar estão usualmente relacionadas ao status hídrico da planta. Neste contexto, reduções no potencial hídrico foliar são comumente observadas em estações quentes (Pritzkow, et al., 2020), bem como regulação das trocas gasosas (Liberato et al., 2006). Adicionalmente, em mudas de *M. guianensis* houve a manutenção das trocas gasosas em níveis basais associada a redução significativa do potencial hídrico foliar em comparação a plantas mantidas próximas à 100% da capacidade de campo (Liberato et al., 2006). Saliente-se, também, que para o monitoramento do déficit hídrico o emprego de sensores termais, que permitem inferir sobre a regulação estomática e a dissipação de energia (Blaya-Ros et al., 2020), tem sido utilizado.

Espera-se que, em cenários climáticos futuros, as regiões de cultivo de eucalipto venham a sofrer secas mais severas e frequentes. Assim, é de suma importância o desenvolvimento de formas de maximizar a eficiência do uso da água e a tolerância à seca nessa espécie. Além das diversas ferramentas e da identificação de mecanismos de tolerância à seca, descritos acima, a busca por materiais genéticos promissores a essa condição ambiental, seja por meio do manejo ou da criação de novos germoplasmas são necessários para desenvolver genótipos tolerantes. Neste contexto, cruzamentos genéticos podem adicionar novas características aos indivíduos provenientes deste processo, embora a complexidade das relações entre tolerância à seca e mecanismos morfofisiológicos possa aumentar (Junior et al., 2020). Com efeito, materiais genéticos compostos por pelo menos três espécies são, aparentemente, mais adaptados e estáveis às variações ambientais onde foram cultivados (Santos et al., 2013).

Na busca por materiais genéticos mais tolerantes à deficiência hídrica em eucalipto, diversos cruzamentos foram realizados neste trabalho, a fim de verificar quais espécies são promissoras do ponto de vista comercial (produtivos e tolerantes à seca), bem como a identificação de biomarcadores de tolerância à seca, como previamente mencionados nos capítulos anteriores. Dentre as espécies utilizadas, *E. urophylla* (enraizamento), *E. grandis* (crescimento), *E. camaldulensis* (tolerância ao déficit hídrico), bem como *E. tereticornis*, *E. brassiana*, *E. longirostrata*, *E. pellita* e *E. resinifera* foram utilizadas (Santos et al., 2013). Cabe mencionar também que foram realizados desde cruzamentos simples (envolvendo duas espécies) até cruzamentos

mais complexos (envolvendo cinco espécies). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar e validar, em condições de campo, bioindicadores de tolerância à seca previamente identificados em experimentos de casa de vegetação. Vale destacar que a plasticidade dos materiais genéticos, ao longo das coletas periódicas, foi também analisada.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Sementes oriundas dos cruzamentos listados na Tabela 1 foram implantadas em uma fazenda da empresa MinasLigas, situada na região de Buritizeiro-Minas Gerais (17° 05'49" S e 44° 53'09" O), local de acentuada deficiência hídrica. Essa região se caracteriza por apresentar altitude de aproximadamente 570 m, solo Tipo 2 (textura média/argila 15-35%) e um histórico pluviométrico bastante crítico sendo que, em 2015, a precipitação média foi em torno de 511,5 mm.

As coletas foram realizadas em setembro de 2019 (6 meses de plantio) e 2020 (18 meses de plantio), representando o final de todo o ciclo anual de seca, possibilitando observar os contrastes entre as progênes sob limitada disponibilidade hídrica. Em 2019, o total anual de precipitação foi de 495,00 mm (Fonte: Cia Ferroligas Minas Gerais MinasLigas) e em 2020 foi de 1122,00 mm (Fonte: INMET). A distribuição das chuvas ao longo do ano é mostrada na figura 1. As coletas foram realizadas em setembro, após o período de maior estiagem (vermelho).

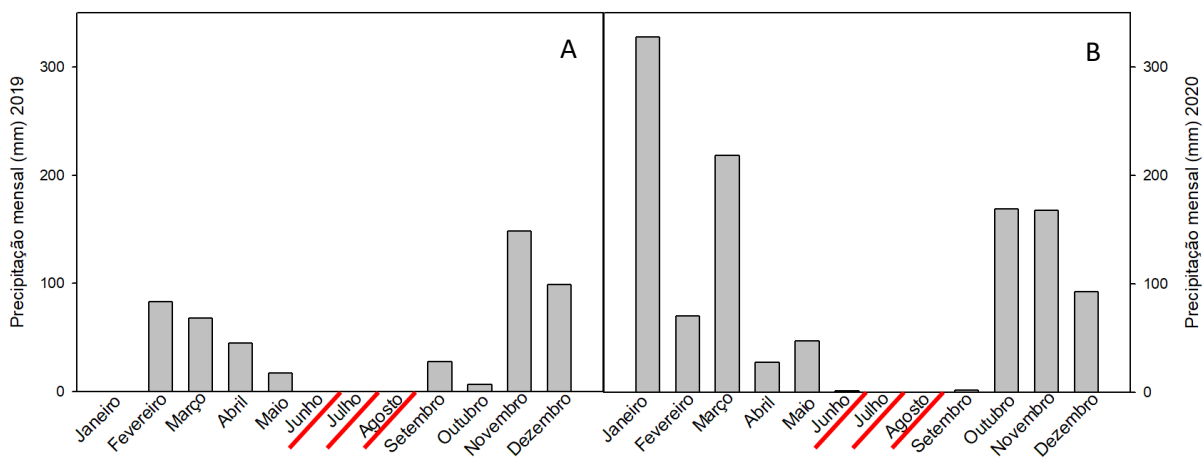


Figura 1- Precipitação mensal nos anos de 2019 (A) e 2020 (B). Meses destacados em vermelho foram, em cada ano, os meses com menor precipitação, sendo as coletas realizadas ao final desse período de seca (setembro).

Tabela 1: Lista de progênies e clones de eucalipto cultivados em campo. Nos cruzamentos foram levados em consideração critérios como tolerância à seca e produtividade.

GG2673	Testemunha (E. urophylla)
GG1923	Testemunha (E. urophylla)
VM01	Testemunha (E. urophylla x E. camaldulensis)
AEC1528	Testemunha (E. grandis x E. urophylla)
I144	Testemunha (E. grandis x E. urophylla)
GG1980	Testemunha (E. urophylla)
GG918xGG918	E. camaldulensis x E. camaldulensis
GG918xVS62	E. camaldulensis x E. camaldulensis
GG682xCNB16	(E. urophylla x E. grandis) x E. urophylla HE
CNB16xCNB16	E. urophylla HE x E. urophylla HE
GG4383xAEC2197	((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))
GG1883xGG2034	E. urophylla x E. grandis HE
GG3633xGG4302	E. camaldulensis x E. brassiana
GG2034xPEL	E. grandis HE x E. pellita
GG682xBRA	(E. urophylla x E. grandis) x (E. brassiana)
GG918xPEL	E. camaldulensis x E. pellita
GG3389xTER	E. urophylla HE x E. tereticornis
GG3633xPEL	E. camaldulensis x E. pellita
AEC2034xLR830	(E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata)
I3000xVM1	(E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)
I3000xVS62	E. camaldulensis x E. camaldulensis
I3000xRES	E. camaldulensis x E. resinifera
VM7xVS2	E. urophylla HE x E. camaldulensis
VM4xTER	E. urophylla HE x E. tereticornis
VM7xLON	E. urophylla HE x E. longirostrata
VM1xCAM	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)
VM1xVM4	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE)
GG1883xAEC2034	(E. urophylla) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))

2.1- Potencial hídrico foliar na antemã e ao meio-dia

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado com o auxílio de uma Bomba de Scholander em folhas completamente expandidas (3^o ou 4^o par de folhas) do terço médio da planta. Os contrastes observados durante a medição do meio-dia (plantas com menor, intermediário e maior potencial hídrico foliar), foram avaliados no período da antemã (aproximadamente 06:00) para verificar o continuum solo-planta-atmosfera.

2.2- Avaliações termográficas

Com o intuito de visualizar os contrastes entre as progênies com diferentes potenciais hídricos, bem como inferir sobre a temperatura foliar das plantas em resposta ao déficit hídrico, folhas completamente expandidas (3º ou 4º par de folhas) do terço médio da planta foram fotografadas com câmera no infravermelho (FLIR systems T360, Nashua, USA).

2.3- Determinação de variáveis morfológicas (área foliar específica, área foliar, comprimento e largura foliar)

Aproximadamente 15 folhas completamente expandidas do terço médio foram coletadas e digitalizadas em scanner (hp ScanJet 200). Em seguida, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. A área foliar específica (AFE) foi determinada pela razão entre a área foliar (cm²) e a massa seca (g). As imagens digitalizadas foram mensuradas no Image-Pro Plus® para obtenção da área foliar (AF), comprimento (C) e largura foliar (L).

2.4- Comparação entre duas metodologias para determinação de área foliar específica

A fim de facilitar o trabalho em campo, a metodologia de determinação da área foliar específica por meio da coleta de discos foliares foram comparadas ao método da folha inteira. Sendo assim, foram coletados quinze discos foliares ($A=1,0297 \text{ cm}^2$) de cinco folhas de cada planta, e levadas à estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até atingirem peso constante, aproximadamente 72 h. A AFE foi determinada segundo (Hunt, 1982) empregando-se a seguinte fórmula: $AFE \text{ (cm}^2 \text{ g}^{-1}) = (\text{área foliar dos discos (cm}^2) \times n^\circ \text{ de discos}) / \text{massa seca dos discos (g)}$.

2.5- Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para a avaliação das premissas de normalidade dos resíduos aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

3- RESULTADOS

3.1- Avaliações morfológicas aos 6 meses (Ano 2019)

Ao se avaliar caracteres morfológicos dos cruzamentos obtidos, uma ampla gama de respostas foi observada. Para facilitar a visualização dessas diferenças observadas para AFE, AF, Comprimento, Largura e Ψ_w , os resultados estão apresentados na forma de um mapa de cores (Tabela 2), com cores variando entre azul (valores mais baixos) ao vermelho (valores mais altos). Assim, clones e progênies como GG2673, GG1823, I144, GG1880, GG682xCNB16, GG1883xGG2034, GG3633xGG4302 e VM7xLON apresentaram maior AFE e menores área, comprimento e largura foliar (Tabela 2). De modo oposto, as progênies GG3633xPEL e VM4xTER apresentaram menor AFE e maiores área, comprimento e largura foliar. Entretanto, os materiais genéticos VM1, AEC2034xLR830 e I3000xVM1 tiveram os menores nos quatro parâmetros. Menores AFE, AF e largura e, maior comprimento foliar foram observados nas progênies GG918xGG918, GG918xVS62, GG2034xPEL, I3000xVS62, I3000xRES e VM1xVM4. Menores AFE e comprimento de folhas, combinados com maiores AF e largura foram observados no clone AEC1528 e na progênie CNB16xCNB16. As progênies GG4383xAEC2197 e GG918xPEL apresentaram menor AFE e largura, ao passo que exibiram maiores AF e comprimento foliar. Maiores AFE e comprimento, combinados à menores AF e largura foram notados nas progênies GG682xBRA, VM7xVS2. Já nas progênies GG3389xTER, VM1xCAM foram observados valores elevados nas quatro variáveis. Por fim, maiores AFE, AF e largura foliar, acompanhados por menor comprimento foram observados apenas na progênie GG1883xAEC2034 (Tabela 2).

Os clones e progênies GG2673, GG1823, I144, GG1880, GG918xGG918, GG1883xGG2034, GG682xBRA, AEC2034xLR830, I3000xVM1, I3000xVS62, VM7xVS2, VM4xTER, VM7xLON, GG1883xAEC2034 e VM1xCAM tiveram Ψ_w menos negativos (maior Ψ_w), indicando manutenção do status hídrico (Tabela 2). O contrário foi observado nos clones e progênies VM1, AEC1528, GG918xVS62, GG682xCNB16, CNB16xCNB16, GG4383xAEC2197, GG3633xGG4302, GG2034xPEL, GG918xPEL, GG3389xTER, GG3633xPEL, I3000xRES e VM1xVM4, ou seja, Ψ_w mais negativo (menor) (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação de caracteres morfológicos e potencial hídrico de folhas de diferentes clones e progênies, aos 6 meses, cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. Foram determinados Área foliar específica (AFE, cm² g⁻¹), Área foliar (AF, cm²), Comprimento (C, cm), Largura (L, cm) e potencial hídrico foliar ao meio-dia (Ψ_w , MPa). Valores variam entre mais baixos (azuis) a mais altos (vermelho). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (P<0,05).

Código	Cruzamentos/Progênies	AFE	Área foliar	Comprimento	Largura	Ψ_w
GG2673	(E. urophylla)	130,76 A	30,33 B	10,13	4,41 B	-1,85 A
GG1923	(E. urophylla)	125,88 A	31,05 B	9,57	4,03 B	-1,92 A
VM01	(E. urophylla x E. camaldulensis)	120,04 B	29,30 B	8,31	3,41 B	-2,44 B
AEC1528	(E. grandis x E. urophylla)	111,72 B	35,36 A	7,47	3,66 B	-2,29 B
I144	(E. grandis x E. urophylla)	124,07 A	27,29 B	7,51	3,42 B	-2,06 A
GG1980	(E. urophylla)	130,87 A	25,03 B	7,51	3,05 B	-2,13 A
GG918xGG918	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	119,24 B	32,34 B	11,84	4,03 B	-2,14 A
GG918xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	120,87 B	27,72 B	11,30	3,65 B	-2,34 B
GG682xCNB16	(E. urophylla x E. grandis) x (E. urophylla HE)	127,80 A	21,32 B	8,93	3,47 B	-2,70 B
CNB16xCNB16	(E. urophylla HE) x (E. urophylla HE)	112,91 B	34,44 A	9,97	4,56 B	-2,61 B
GG4383xAEC2197	((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	114,42 B	36,17 A	11,58	4,34 B	-2,25 B
GG1883xGG2034	(E. urophylla) x (E. grandis HE)	128,11 A	24,38 B	9,16	3,90 B	-1,86 A
GG3633xGG4302	(E. camaldulensis) x (E. brassiana)	141,10 A	28,21 B	9,42	4,36 B	-2,22 B
GG2034xPEL	(E. grandis HE) x (E. pellita)	112,05 B	30,55 B	11,00	4,12 B	-2,51 B
GG682xBRA	(E. urophylla x E. grandis) x (E. brassiana)	134,25 A	29,80 B	10,74	3,99 B	-2,13 A
GG918xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	98,16 B	39,41 A	14,78	4,21 B	-2,21 B
GG3389xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	126,18 A	41,45 A	11,68	5,18 A	-2,47 B
GG3633xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	108,79 B	41,95 A	11,72	5,36 A	-2,37 B
AEC2034xLR830	(E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata)	112,78 B	25,92 B	10,23	3,81 B	-2,03 A
I3000xVM1	(E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)	110,73 B	27,59 B	10,14	4,16 B	-2,02 A
I3000xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	108,82 B	25,04 B	10,84	3,83 B	-2,13 A
I3000xRES	(E. camaldulensis) x (E. resinifera)	111,73 B	27,77 B	10,81	3,93 B	-2,22 B
VM7xVS2	(E. urophylla HE) x (E. camaldulensis)	133,70 A	28,15 B	10,58	4,11 B	-1,93 A
VM4xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	109,13 B	43,56 A	12,33	5,11 A	-1,92 A
VM7xLON	(E. urophylla HE) x (E. longirostrata)	128,70 A	19,17 B	9,17	3,49 B	-2,00 A
VM1xCAM	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	143,88 A	35,30 A	10,87	4,83 A	-1,93 A
VM1xVM4	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE)	116,48 B	30,80 B	10,74	4,43 B	-2,48 B
GG1883xAEC2034	(E. urophylla) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	130,91 A	35,92 A	10,07	5,55 A	-2,13 A

Análise de correlação de Pearson (r) e regressão linear também foram avaliadas e interações significativas foram evidenciadas entre AFE x C, AF x C, AF x

L e C x L, o que indica, ao menos em parte, que essas variáveis possuem ajustes ao serem analisadas de modo pareado. Assim, uma correlação negativa foi observada entre AFE x C em que menores AFE são acompanhadas por maior comprimento foliar (R^2) (Tabela 3, Figura 2A). Destaca-se, ainda, que a AF se correlaciona positivamente com comprimento e largura foliar (Figura 2B e C, respectivamente) e, assim, plantas com maior AF apresentam maior C e L. Cumpre mencionar também que AF x C ($R^2=0,45$) e AF x L ($R^2=0,66$) indicam que grande parte da variação observada é explicada pelos modelos matemáticos. Embora C x L apresentem reduzido r e R^2 , tendência de incrementos no comprimento à medida que se aumenta a largura foram observados (Figura 2D). Em relação ao potencial hídrico, nenhuma correlação significativa foi observada (Tabela 3).

Tabela 3: Análises de correlação e coeficiente de regressão de variáveis morfológicas (AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), AF (cm^2), C (cm), L (cm)) e de potencial hídrico (Ψ_w MPa) foliares em plantios aos 6 meses de cultivo em campo. Diferenças estatísticas foram observadas a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

	AFE x AF	AFE x C	AFE x L	AFE x Ψ_w	AF x C	AF x L	AF x Ψ_w	C x L	C x Ψ_w	L x Ψ_w
n (pares)	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
r (Pearson)	-0,30	-0,54	-0,05	0,27	0,67	0,82	-0,09	0,48	-0,01	0,01
R²	0,09	0,29	0,00	0,07	0,45	0,66	0,01	0,23	0,00	0,00
t	-1,5411	-3,1627	-0,2309	1,3698	4,4716	6,8973	-0,4324	2,6991	-0,071	0,0646
GL	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
p	0,14	0,00	0,82	0,18	0,00	< 0,0001	0,67	0,01	0,94	0,95

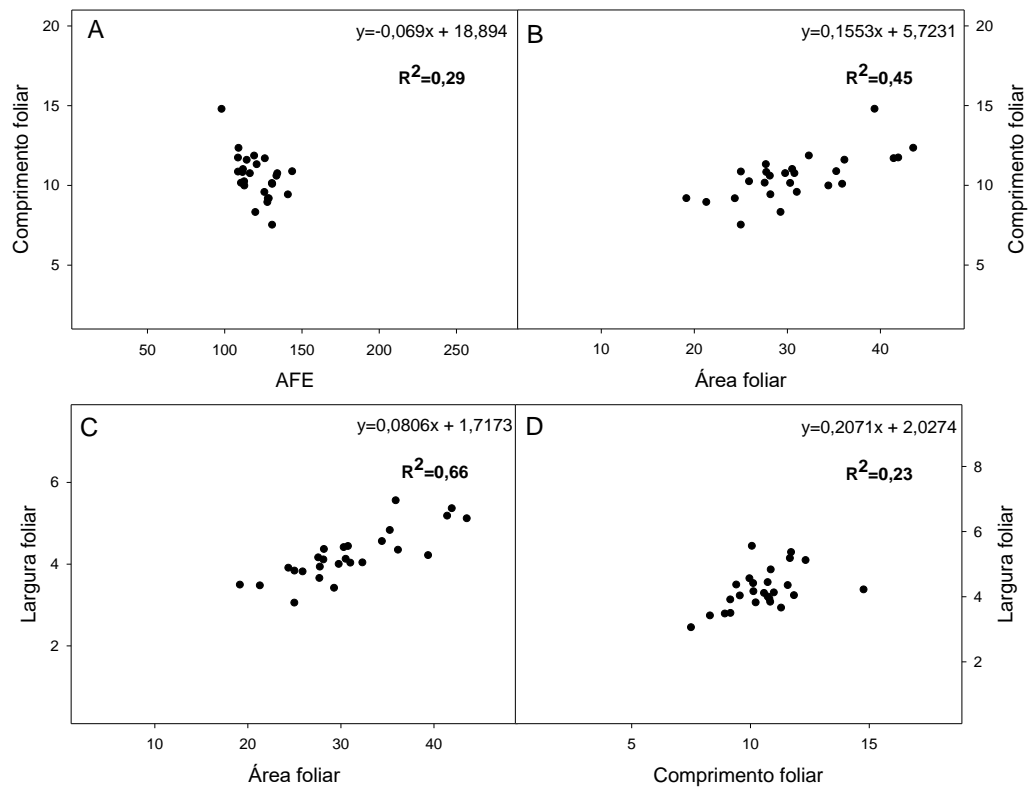


Figura 2: Análise de regressão linear em clones e progênies aos seis meses de idade cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. (A)- comprimento foliar x AFE; (B)- Comprimento foliar x Área foliar; (C)- Largura foliar x Área foliar; e (D)- Largura foliar x Comprimento foliar.

Com o intuito de determinar mecanismos de tolerância à seca em eucalipto, buscou-se, também, investigar metodologias que facilitem o trabalho em condições campo. Para tanto, a AFE, variável extremamente promissora como bioindicador de tolerância, foi avaliada por duas formas: (i) a AFE de folha inteira (aproximadamente 15 folhas) e (ii) discos foliares (coleta de 5 discos de 5 folhas). Em resumo, as duas formas de determinação de AFE apresentaram-se como altamente eficientes e com pequenas diferenças entre si para todos os genótipos trabalhados (Tabela 4).

Os dados apresentados na Tabela 4 foram submetidos à análise de correlação de Pearson ($r=0,91$) e ao coeficiente de regressão linear ($R^2=0,83$) (Figura 3). Em função não apenas dos altos e significativos valores tanto para r quanto R^2 mas também da facilidade de aplicação em condições de campo, ambas as metodologias podem ser utilizadas para determinação da AFE.

Tabela 4: Comparação entre duas metodologias para determinação da AFE (cm² g⁻¹, folha inteira e discos). Clones e progênies cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. Valores variam entre mais baixos (azuis) a mais altos (vermelho). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (p<0,05).

Código	Cruzamentos/Progênies	AFE folha		AFE disco	
		inteira			
GG2673	(E. urophylla)	130,76	A	105,61	A
GG1923	(E. urophylla)	125,88	A	113,50	A
VM01	(E. urophylla x E. camaldulensis)	120,04	B	107,53	A
AEC1528	(E. grandis x E. urophylla)	111,72	B	99,01	B
I144	(E. grandis x E. urophylla)	124,07	A	107,48	A
GG1980	(E. urophylla)	130,87	A	113,82	A
GG918xGG918	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	119,24	B	98,40	B
GG918xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	120,87	B	99,18	B
GG682xCNB16	(E. urophylla x E. grandis) x (E. urophylla HE)	127,80	A	109,04	A
CNB16xCNB16	(E. urophylla HE) x (E. urophylla HE)	112,91	B	91,84	B
GG4383xAEC2197	((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	114,42	B	106,37	A
GG1883xGG2034	(E. urophylla) x (E. grandis HE)	128,11	A	111,88	A
GG3633xGG4302	(E. camaldulensis) x (E. brassiana)	141,10	A	118,04	A
GG2034xPEL	(E. grandis HE) x (E. pellita)	112,05	B	103,79	A
GG682xBRA	(E. urophylla x E. grandis) x (E. brassiana)	134,25	A	114,04	A
GG918xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	98,16	B	89,70	B
GG3389xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	126,18	A	105,43	A
GG3633xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	108,79	B	100,51	B
AEC2034xLR830	(E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata)	112,78	B	97,64	B
I3000xVM1	(E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)	110,73	B	90,13	B
I3000xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	108,82	B	93,10	B
I3000xRES	(E. camaldulensis) x (E. resinifera)	111,73	B	97,68	B
VM7xVS2	(E. urophylla HE) x (E. camaldulensis)	133,70	A	116,13	A
VM4xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	109,13	B	94,46	B
VM7xLON	(E. urophylla HE) x (E. longirostrata)	128,70	A	112,23	A
VM1xCAM	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	143,88	A	124,82	A
VM1xVM4	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE)	116,48	B	101,08	B
GG1883xAEC2034	(E. urophylla) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	130,91	A	112,25	A

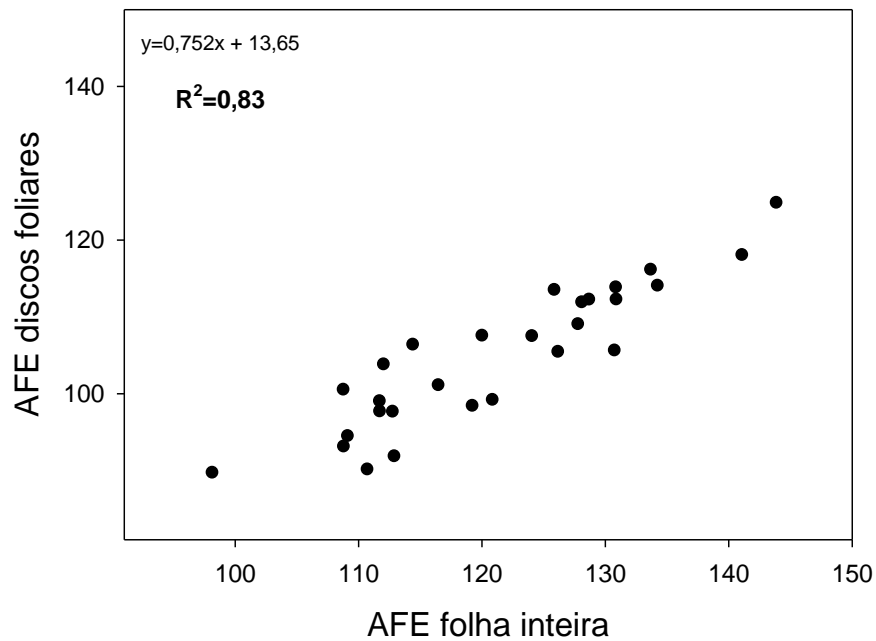


Figura 3: Análise de regressão linear comparando as metodologias de AFE (folha inteira e discos foliares) em clones e progênies aos seis meses de idade, cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG.

3.2- Avaliações morfológicas aos 18 meses (Ano 2020)

Ao se avaliar caracteres morfológicos dos cruzamentos obtidos tanto no primeiro ano (após 6 meses de cultivo – dados apresentados acima) quanto após 18 meses, uma ampla gama de respostas foi observada. Os clones e progênies como VM1, GG1823, GG1880, GG682xBRA e VM7xVS2 apresentaram maior AFE e menores AF, C e L foliar (Tabela 5). Por outro lado, as progênies GG4383xAEC2197 e GG3389xTER exibiram menor AFE ao passo que AF, C e L foliar foram maiores. Folhas apresentando menores AFE, AF, C e L foram observadas nas progênies GG918xGG918, GG918xVS62, GG682xCNB16, GG2034xPEL, AEC2034xLR830, I3000xVM1, I3000xVS62, I3000xRES, VM7xLON e VM1xVM4. Por outro lado, menores AFE, AF e C, acompanhados por um maior L foliar foram observados nos genótipos GG2673, I144, GG1883xAEC2034, GG3633xPEL e VM1xCAM. Materiais como AEC1528, CNB16xCNB16, GG3633xGG4302 e GG918xPEL apresentaram menores AFE e maiores AF, C e L. Já a progênie VM4xTER apresenta menor AFE e largura, juntamente com maiores AF e comprimento foliar (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação de caracteres morfológicos e potencial hídrico de folhas de diferentes clones e progênes, aos 18 meses, cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. Foram determinados AFE, AF, Comprimento, Largura e Ψ_w . Valores variam entre valores mais baixos (azuis) a mais altos (vermelho). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Código	Cruzamentos/Progênes	AFE	Área foliar	Comprimento	Largura	Ψ_w (Mpa)
GG2673	(E. urophylla)	100.81 A	41.34 B	14.53 C	4.74 A	-2.35
GG1923	(E. urophylla)	105.01 A	32.69 C	14.26 C	3.83 B	-2.43
VM01	(E. urophylla x E. camaldulensis)	94.51 A	25.48 C	12.60 C	3.26 B	-2.75
AEC1528	(E. grandis x E. urophylla)	85.89 B	42.77 B	14.22 C	4.84 A	-2.36
I144	(E. grandis x E. urophylla)	94.67 A	34.31 C	13.82 C	4.25 A	-2.60
GG1980	(Eucalyptus urophylla)	100.81 A	29.75 C	14.04 C	3.55 B	-2.54
GG918xGG918	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	86.35 B	36.26 C	16.21 C	3.35 B	-2.37
GG918xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	86.69 B	32.76 C	15.48 C	3.55 B	-2.67
GG682xCNB16	(E. urophylla x E. grandis) x (E. urophylla HE)	91.77 B	30.29 C	14.13 C	3.59 B	-2.61
CNB16xCNB16	(E. urophylla HE) x (E. urophylla HE)	90.89 B	40.83 B	14.41 C	4.61 A	-2.42
GG4383xAEC2197	((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	81.49 B	49.95 A	17.10 A	4.68 A	-2.27
GG1883xGG2034	(E. urophylla) x (E. grandis HE)	103.44 A	38.41 B	14.21 C	4.31 A	-2.07
GG1883xAEC2034	(E. urophylla) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	97.27 A	43.48 B	15.33 C	4.52 A	-2.72
GG3633xGG4302	(E. camaldulensis) x (E. brassiana)	91.24 B	42.58 B	15.34 C	4.79 A	-2.48
GG2034xPEL	(E. grandis HE) x (E. pellita)	86.51 B	35.09 C	14.15 C	3.74 B	-2.58
GG682xBRA	(E. urophylla x E. grandis) x (E. brassiana)	103.63 A	30.03 C	15.40 C	3.97 B	-2.54
GG918xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	88.31 B	36.49 C	13.23 C	4.16 A	-2.87
GG3389xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	81.89 B	57.74 A	17.40 A	4.99 A	-2.43
GG3633xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	105.43 A	40.49 B	13.79 C	4.82 A	-2.14
AEC2034xLR830	(E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata)	82.97 B	31.72 C	13.24 C	3.85 B	-2.55
I3000xVM1	(E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)	80.65 B	30.32 C	13.44 C	3.34 B	-2.73
I3000xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	77.12 B	30.31 C	16.41 C	3.20 B	-2.41
I3000xRES	(E. camaldulensis) x (E. resinifera)	77.08 B	34.17 C	15.92 C	3.41 B	-2.87
VM7xVS2	(E. urophylla HE) x (E. camaldulensis)	96.78 A	29.39 C	13.20 C	3.83 B	-2.50
VM4xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	73.53 B	50.33 A	21.21 A	3.90 B	-2.50
VM7xLON	(E. urophylla HE) x (E. longirostrata)	91.47 B	19.49 C	9.49 C	3.54 B	-2.25
VM1xCAM	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	101.20 A	39.73 B	15.55 C	4.45 A	-2.39
VM1xVM4	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE)	85.86 B	34.88 C	15.03 C	3.75 B	-2.49

Análise de correlação de Pearson (r) e regressão linear também foram realizadas e interações significativas foram evidenciadas entre AFE x C, AF x C, AF x L e L x Ψ_w , indicando que essas variáveis possuem, aparentemente, ajustes ao serem analisadas lado a lado (Tabela 6 e Figura 4). Correlação negativa foi obtida em AFE x C em que menores AFE são acompanhadas por maior comprimento foliar ($R^2=0,19$) (Figura 4A). Destaca-se que a AF se correlaciona positivamente com C e L foliar e, assim, plantas com maior AF apresentam maior C e L (Figura 4B-C). Cumpre mencionar também que a relação entre as variáveis exibe AF x C ($R^2= 0,51$) e AF x L ($R^2= 0,56$) indicam que grande parte da variação observada é explicada pelos modelos matemáticos. Quanto ao potencial hídrico, embora que ainda singular, indícios de correlações podem ser evidenciados à medida que a idade do plantio aumenta. L x Ψ_w apresenta reduzido r e R^2 embora seja observada tendência a incrementos no Ψ_w à medida que L aumenta (Figura 4D).

Tabela 6: Análises de correlação e coeficiente de regressão de variáveis morfológicas (AFE, AF, C, L) e potencial hídrico (Ψ_w) foliares em plantios aos 18 meses de cultivo em campo. Diferenças estatísticas foram observadas a 5% de probabilidade ($p<0,05$).

	AFE x AF	AFE x C	AFE x L	AFE x Ψ_w	AF x C	AF x L	AF x Ψ_w	C x L	C x Ψ_w	L x Ψ_w
n (pares)	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
r (Pearson)	-0,22	-0,43	0,27	0,32	0,71	0,75	0,24	0,17	0,01	0,42
R²	0,05	0,19	0,07	0,10	0,51	0,56	0,06	0,03	0,00	0,18
t	-1,1482	-2,4461	1,418	1,694	5,1522	5,7707	1,2473	0,9025	0,053	2,3611
GL	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
p	0,26	0,02	0,17	0,10	< 0,0001	< 0,0001	0,22	0,38	0,96	0,03

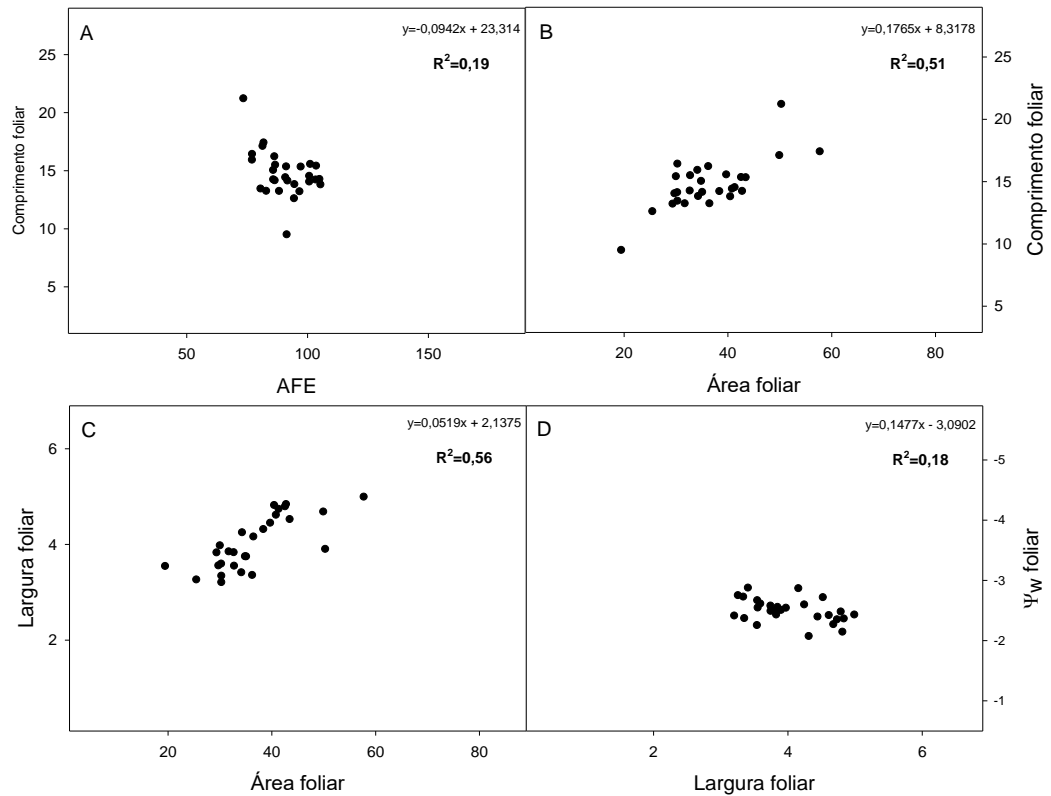


Figura 4: Análise de regressão linear em clones e progênies aos seis meses de idade cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. (A)- comprimento x AFE; (B)- Comprimento foliar x Área foliar; (C)- Largura foliar x Área foliar; e (D)- Largura foliar x Ψ_w foliar.

Assim como ocorreu em plantas aos 6 meses de cultivo, uma comparação entre metodologias para determinação da AFE de folha inteira e discos foliares foi também realizada em plantas aos 18 meses de cultivo. De igual forma, observou-se adequada semelhança entre as formas ora utilizadas (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação entre duas metodologias para determinação da AFE ($\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$, folha inteira e discos). Clones e progênies cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. Valores variam entre mais baixos (azuis) a mais altos (vermelho). Letras maiúsculas denotam diferenças significativas entre os clones de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Código	Cruzamentos/Progênies	AFE folha inteira		AFE disco	
GG2673	(E. urophylla)	100.81	A	97.24	A
GG1923	(E. urophylla)	105.01	A	99.90	A
VM01	(E. urophylla x E. camaldulensis)	94.51	A	88.83	B
AEC1528	(E. grandis x E. urophylla)	85.89	B	82.74	B
I144	(E. grandis x E. urophylla)	94.67	A	85.70	B
GG1980	(E. urophylla)	100.81	A	96.23	A
GG918xGG918	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	86.35	B	81.51	B
GG918xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	86.69	B	82.33	B
GG682xCNB16	(E. urophylla x E. grandis) x (E. urophylla HE)	91.77	B	87.74	B
CNB16xCNB16	(E. urophylla HE) x (E. urophylla HE)	90.89	B	86.78	B
GG4383xAEC2197	((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	81.49	B	77.45	B
GG1883xGG2034	(E. urophylla) x (E. grandis HE)	103.44	A	98.45	A
GG1883xAEC2034	(E. urophylla) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis))	97.27	A	91.23	A
GG3633xGG4302	(E. camaldulensis) x (E. brassiana)	91.24	B	88.69	B
GG2034xPEL	(E. grandis HE) x (E. pellita)	86.51	B	86.16	B
GG682xBRA	(E. urophylla x E. grandis) x (E. brassiana)	103.63	A	94.73	A
GG918xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	88.31	B	84.95	B
GG3389xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	81.89	B	79.52	B
GG3633xPEL	(E. camaldulensis) x (E. pellita)	105.43	A	88.64	B
AEC2034xLR830	(E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata)	82.97	B	83.28	B
I3000xVM1	(E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)	80.65	B	77.54	B
I3000xVS62	(E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	77.12	B	73.62	B
I3000xRES	(E. camaldulensis) x (E. resinifera)	77.08	B	71.65	B
VM7xVS2	(E. urophylla HE) x (E. camaldulensis)	96.78	A	95.16	A
VM4xTER	(E. urophylla HE) x (E. tereticornis)	73.53	B	79.27	B
VM7xLON	(E. urophylla HE) x (E. longirostrata)	91.47	B	95.59	A
VM1xCAM	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. camaldulensis)	101.20	A	101.22	A
VM1xVM4	(E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE)	85.86	B	84.76	B

A correlação de Pearson ($r=0,90$) e a regressão linear ($R^2=0,80$) obtidas em plantios com 18 meses foi alta e significativa indicando, novamente, que as metodologias podem ser utilizadas, de modo eficiente, para a determinação da AFE (Figura 5).

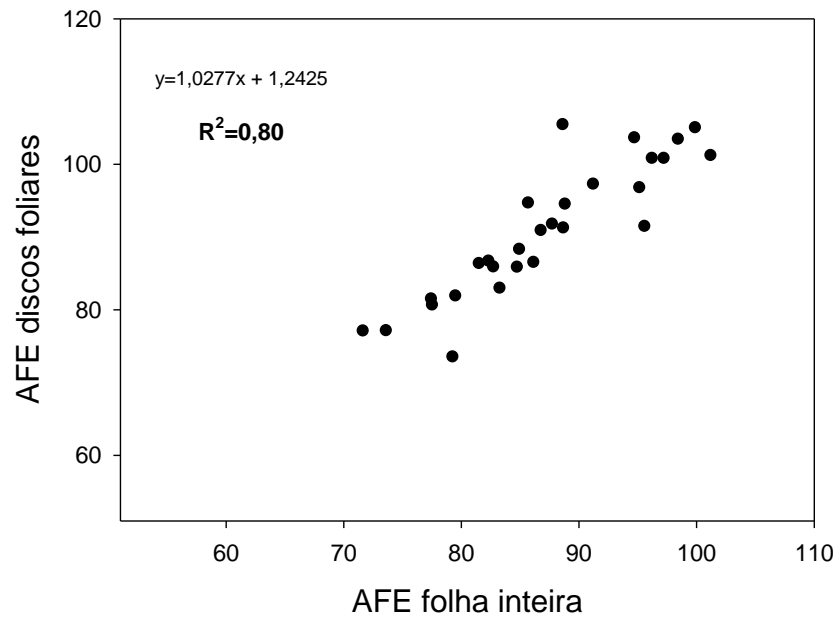


Figura 5: Análise de regressão linear comparando a metodologia de AFE folha inteira e AFE discos foliares em clones e progênies aos 18 meses de idade cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG.

O comportamento das avaliações termográficas associadas ao Ψ_w ao meio-dia e antemanhã também foram analisados sem, no entanto, observarmos correlação entre os dados. Cabe mencionar que o Ψ_w ao meio-dia e na antemanhã apresentou alta correlação ($r=0,89$) e alto coeficiente de regressão ($R^2=0,80$) (Tabela 8 e Figura 6).

Tabela 8: Análises de correlação e coeficiente de regressão de Ψ_w ao meio-dia (MPa), Ψ_w antemanhã (MPa) e termografia em plantios aos 18 meses de cultivo. Diferenças estatísticas foram observadas a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

	Ψ_w meio-dia x Ψ_w antemanhã	Ψ_w meio-dia x Termografia	Ψ_w antemanhã x Termografia
n (pares) =	6	6	6
r (Pearson) =	0,89	0,02	0,16
R2 =	0,80	0,00	0,03
t =	3,9582	0,0353	0,3222
GL =	4	4	4
(p) =	0,02	0,97	0,76

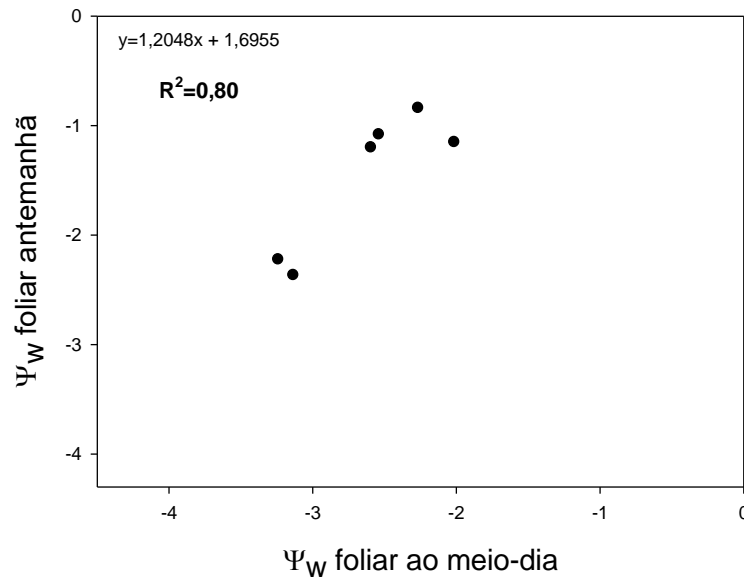


Figura 6: Análise de regressão linear comparando Ψ_w foliar na antemanhã e ao meio-dia em clones e progênies aos 18 meses de idade cultivados em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG.

3.3- Comparações morfológicas entre plantas aos 6 meses e 18 meses

As avaliações morfológicas e de potencial hídrico foliares realizadas com plantas de diferentes idades podem também auxiliar na seleção precoce de materiais genéticos. Com efeito, tal comparação possibilita que se acompanhe o desempenho dos materiais genéticos em campo ao longo do seu desenvolvimento. A AFE (Figura 7A, $r=0,59$ e $R^2=0,35$), AF (Figura 7B, $r=0,77$ e $R^2=0,60$), C (Figura 7C, $r=0,40$ e $R^2=0,16$) e L (Figura 7D, $r=0,57$ e $R^2=0,33$) foram significativas e com alta correlação (r) e coeficiente de regressão (R^2) (Tabela 9 e Figura 7). Diferentemente do observado para parâmetros da morfologia foliar, o Ψ_w obteve valores, tanto de correlação ($r=0,21$) e coeficiente de regressão ($R^2=0,05$) muito baixos (Tabela 9).

Tabela 9: Análises de correlação e coeficiente de regressão comparando variáveis morfológicas e de potencial hídrico foliares de clones e progênies aos 6 e 18 meses de cultivo em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG. Diferenças estatísticas foram observadas a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

	AFE (2019 x 2020)	AF (2019 x 2020)	C (2019 x 2020)	L (2019 x 2020)	Ψ_w (2019 x 2020)
n (pares)	28	28	28	28	28
r (Pearson)	0,59	0,77	0,40	0,57	0,21
R²	0,35	0,60	0,16	0,33	0,05
t	3,708	6,242	2,1977	3,5759	1,1088
GL	26	26	26	26	26
p	0,00	< 0,0001	0,04	0,00	0,28

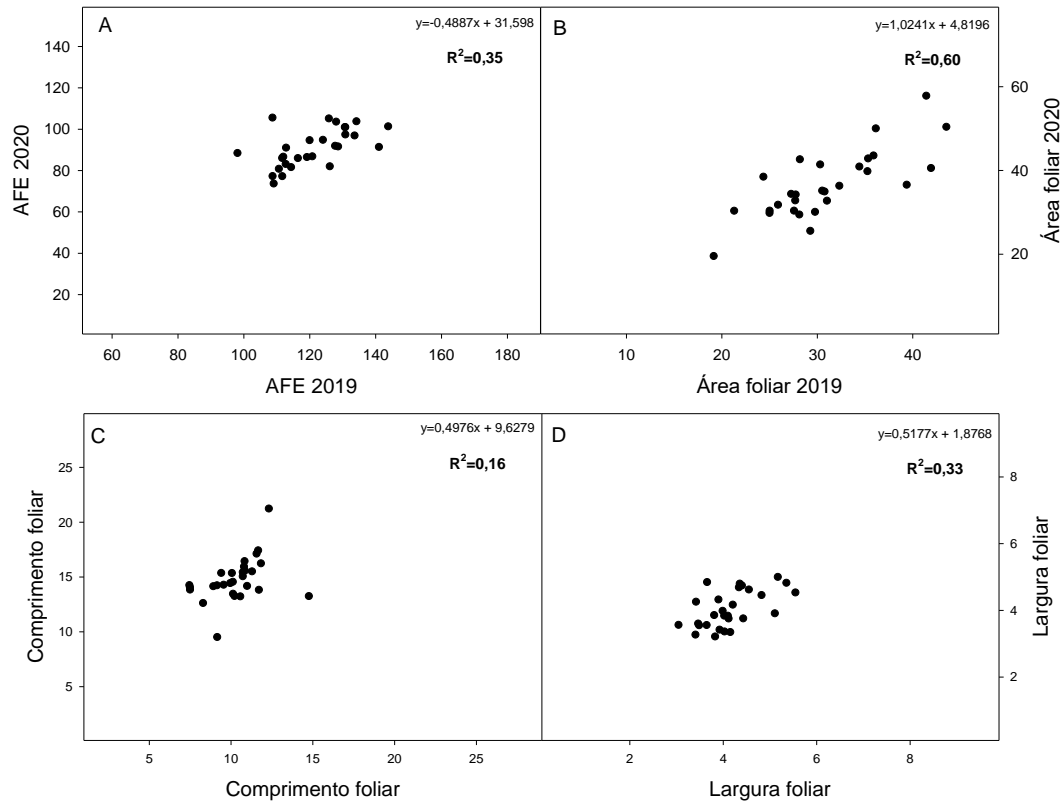


Figura 7: Análise de regressão linear comparando AFE, Área foliar, comprimento e largura foliar em clones e progênies aos 6 meses e aos 18 meses de em campo com elevada restrição hídrica em Buritizeiro-MG.

4- DISCUSSÃO

Um dos grandes, senão o maior, desafios ao trabalhar com espécies arbóreas, como o eucalipto, está relacionado ao ciclo longo dessas espécies, bem como os potenciais inferências realizadas de acordo com a idade das mesmas. Neste contexto, a presente proposta buscou identificar potenciais bioindicadores de tolerância à seca em clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação (capítulos 1 e 2) com a posterior validação dos mesmos, em condições de campo, quando cultivados em ambiente com elevada restrição hídrica (Buritizeiro-MG). Essa busca por bioindicadores de tolerância à seca servirá não apenas como ferramenta para seleção precoce de materiais genéticos, mas também possibilitará a avaliação da plasticidade fenotípico das progênies.

Os cruzamentos gerados pelo programa de melhoramento do eucalipto não foram, até o momento, devidamente avaliados e, portanto, as análises aqui descritas foram baseadas em experimentos com condições controladas. Com efeito, tais análises são ainda exploratórias e buscam a maior compreensão das diferentes

estratégias adotadas pelos materiais genéticos. Nesse sentido, parâmetros morfológicos e fisiológicos têm sido amplamente utilizados como indicadores de tolerância à seca (Xu et al., 2020). Estes mesmos autores verificaram que o tamanho da folha poderia ser um preditor de tolerância à seca em arbustos oriundos de ambientes com umidade contrastante. Além disso, reduções na área foliar específica são também importantes para conferir tolerância em plantas sujeitas a escassez hídrica (Ackerly et al., 2001). Aqui nós avaliamos não só o tamanho da folha, mas também área foliar específica, área foliar, comprimento e largura da folha em diferentes idades. Dessa forma, foi possível observar que as progênies apresentam diferentes estratégias para lidar com a deficiência hídrica e que algumas delas se mantem ao longo do tempo. Cabe mencionar também que tais variáveis podem ser consideradas, em larga escala, como potenciais bioindicadores da tolerância à seca em plantas de eucalipto.

Progênies híbridas (e.g. GG918xGG918, GG918xVS62, GG2034xPEL, AEC2034xLR830, I3000xVM1, I3000xVS62, I3000xRES e VM01xVM4) tanto aos 6 quanto aos 18 meses apresentaram menores AF e AFE, sugerindo que essas folhas apresentem maior espessura da lâmina foliar (Tabelas 2 e 5). Por outro lado, clones e progênies incluindo GG2673, GG1823, I144, GG1880, GG1883xGG2034, GG682xBRA e VM7xVS2, apresentaram maior AFE e, no entanto, menor AF individual nos dois períodos de avaliação (2019 e 2020). Tais resultados indicam que mesmo que a superfície foliar seja menor, provavelmente a espessura das mesmas seja diminuída (podendo ser explicada pela menor massa) (Tabelas 2 e 5). Não obstante, reduções da AFE seguidas por maiores AF, como observado nas progênies GG4383xAEC2197 e VM4xTER tanto aos 6 quanto aos 18 meses de idade, podem estar associadas, ao menos parcialmente, a variações no comprimento e largura da folha, que funcionariam como mecanismo de captação de energia luminosa (Tabelas 2 e 5). É importante mencionar também que as progênies ora mencionadas apresentaram o mesmo padrão nos dois períodos de avaliação indicando, assim, que pelo menos até 18 meses, tais características sejam mantidas. Em consonância, as análises de correlação de Pearson e coeficiente de regressão (Tabela 9) suportam a manutenção dessas características. Além disso, outro fator importante relacionado a diferenças encontradas dentro desse gênero pode estar associado aos diferentes formatos exibidos pelas folhas avaliadas. Variações morfológicas e anatômicas foram

também observadas em 10 espécies de *Ceanothus*, nas quais diferentes estratégias para lidar com a seca foram observadas (Fletcher et al., 2018).

Não somente a morfologia foliar, mas também a arquitetura da copa (estrutura do dossel) é importante para conferir maior tolerância ao déficit hídrico, em larga extensão, devido à radiação solar. De modo geral, em plantios florestais, plantas com altura, bem como a estrutura do dossel medianas, foram caracterizadas por maior tolerância à seca, indicando que tais variáveis possam também auxiliar na sobrevivência desses plantios (Xu et al., 2018). Dessa forma, ajustes na área foliar, bem como arquitetura da copa, apresentam-se como mecanismos importantes frente a cenários de déficit hídrico.

A manutenção do *status* hídrico durante os períodos mais quentes do dia (12:00 horas) permite avaliar, de modo geral, o grau de hidratação das plantas. Embora não tenha sido observado um efeito direto entre morfologia e potencial hídrico foliar, algumas progênies foram, aparentemente, mais afetadas pelo déficit hídrico promovendo assim, reduções substanciais do potencial hídrico (Tabela 2).

Além da busca por bioindicadores, a operacionalização das atividades em campo também tem sido almejada. Como previamente mencionado, este trabalho foi, sobretudo exploratório e, então, análises como comprimento, largura, área foliar e área foliar específica foram realizadas através da digitalização de folhas e posterior medição. Tendo em vista que a AFE é um bioindicador promissor de tolerância à seca, pode-se utilizar em campo a metodologia de discos foliares (item 2.4). Uma vez que observamos alto coeficiente de correlação e de determinação entre as duas análises, as duas podem ser recomendadas embora, em condições de campo, a metodologia do disco foliar é mais rápida e eficaz.

Tomados em conjunto, os dados apresentados aqui, mostram um vasto caminho a percorrer para compreender os mecanismos de tolerância à seca em eucalipto; todavia, os primeiros passos já foram efetivamente dados. O uso de progênies oriundas de genótipos considerados de elite pelas empresas do setor florestal proporciona uma riqueza de materiais genéticos. Até o presente momento, é possível observar que variáveis importantes, como área foliar específica, área foliar e potencial hídrico (Ψ_w) foliar tem se mostrado consistentes e que, portanto, podem auxiliar em programas de melhoramento genético do eucalipto em resposta a situações de seca, cada vez mais intensas e recorrentes.

5- CONCLUSÕES

Em condições de campo, as progênies utilizadas apresentaram diferentes estratégias associadas à morfologia foliar e manutenção do teor de água para lidarem com a limitação hídrica.

- A metodologia de determinação da área foliar específica por discos foliares também se mostrou eficaz, rápida e prática para trabalhos em condições de campo;
- Materiais genéticos como GG918xVS62 (*E. camaldulensis* x *E. camaldulensis*), GG918xGG918 (*E. camaldulensis* x *E. camaldulensis*), VM1xVM4 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) x (*E. urophylla* HE), GG2034xPEL (*E. grandis* HE x *E. pellita*), I3000xVM1 ((*E. camaldulensis*) x (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*), AEC2034xLR830 (*E. urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*)) x (*E. longirostrata*), VM4xTER (*E. urophylla* HE x *E. tereticornis*) e GG4383xAEC2197 ((*E. grandis* x *E. brassiana*) x *E. pellita*) x (*E. urophylla* x (*E. camaldulensis* x *E. grandis*)) apresentaram reduções na morfologia foliar aos 6 e 18 meses de avaliação e, portanto, são progênies com potencial tolerância à seca e podem ser mais trabalhados em programas de melhoramento genético;
- A boa correlação observada entre as épocas de avaliação permitiu e permitirá avaliar o comportamento dessas progênies durante o seu crescimento e com isso indicar qual a melhor idade para coleta e determinação dos bioindicadores;
- Até o momento, os bioindicadores identificados em casa de vegetação e validados em condições de campo, tem se mostrado uma ferramenta de grande importância para o setor florestal, pois permitirá que cada empresa possa usá-los como fator de seleção em seus programas de melhoramento genético.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerly DD, Knight CA, Weiss SB, Barton K, Starnmer KP (2002) Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia* 130:449–457.
- Amrutha S, Parveen ABM, Muthupandi M, Vishnu K, Bisht SS, Sivakumas V, Dasgupta MG (2021) Characterization of *Eucalyptus camaldulensis* clones with contrasting response to short-term water stress response. *Acta Physiologiae Plantarum* 43:14.
- Blaya-Ros PJ, Blanco V, Domingo R, Soto-Valles F, Torres-Sánchez R (2019) Feasibility of low-cost thermal imaging for monitoring water stress in young and mature sweet cherry Trees. *Applied Sciences*. 10(16):5461.
- Carignato A, Vázquez-Piqué J, Tapias R, Ruiz F, Fernández M (2019) Variability and plasticity in cuticular transpiration and leaf permeability allow differentiation of eucalyptus clones at an early age. *Forests* 11, 9.
- Fletcher LR, Cui H, Callahan H, Scoffoni C, John, GP, Bartlett MK, Burge DO (2018) Evolution of leaf structure and drought tolerance in species of Californian *Ceanothus*. *American Journal of Botany* 105(10): 1672–1687.
- Junior JLFC, Araújo MJ, Paula RC, Queiroz TB, Hakamada RE, Hubbard RM (2020) Quantifying turgor loss point and leaf water potential across contrasting *Eucalyptus* clones and sites within the TECHS research platform. *Forest Ecology and Management* Vol 475, 118454.
- Liberato MAR, Gonçalves JFC, Chevreuil LR, Junior ARN, Fernandes AV, Junior UMS (2006) Leaf water potential, gas exchange and chlorophyll a fluorescence in acariquara seedlings (*Minquartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(2), 315-323.
- Pritzkow C, Szota C, Williamson VG, Arndt SK (2020) Phenotypic plasticity of drought tolerance traits in a widespread eucalypt (*Eucalyptus obliqua*). *Forests* 11, 1371.
- Santos GA, Resende MDV, Silva LD, Higa A, Assis TF (2013) adaptabilidade de híbridos multiespécies de eucalyptus ao estado do rio grande do sul. *Revista Árvore*, v.37, n.4, p.759-769.
- Susiluoto S & Berninger F (2007) Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. *Silva Fennica* 41(2).
- Xu GQ, Arndt SK, Farrell C (2020) Leaf traits of drought tolerance for 37 shrub species originating from a moisture gradient. *Water* 2, 1626.
- Xu P, Zhou T, Yi C, Fang W, Hendrey G, Zhao X (2018) Forest drought resistance distinguished by canopy height. *Environmental Research Letters* 13 075003.

7- CONCLUSÕES GERAIS

Os experimentos em casa de vegetação com posterior validação em condições de campo possibilitaram a identificação, a contento, de potenciais bioindicadores de tolerância à seca em Eucalipto, dentre os quais, podemos citar:

- Presença de estômatos nas duas faces foliares (plantas anfiestomáticas);
- Folhas com poucos espaços intercelulares;
- Parênquima paliçádico nas duas faces foliares;
- Menor área foliar específica;
- Plantas com superfícies foliares mais frias (avaliações termográficas);
- Maior número de vasos do xilema de menor calibre;
- Dentre os materiais genéticos testados, para os parâmetros fisiológicos de tolerância a seca se destacaram as progênies: GG918xVS62 (E. camaldulensis x E. camaldulensis), GG918xGG918 (E. camaldulensis x E. camaldulensis), VM1xVM4 (E. urophylla x E. camaldulensis) x (E. urophylla HE), GG2034xPEL (E. grandis HE x E. pellita), I3000xVM1 ((E. camaldulensis) x (E. urophylla x E. camaldulensis)), AEC2034xLR830 (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)) x (E. longirostrata), VM4xTER (E. urophylla HE x E. tereticornis) e GG4383xAEC2197 ((E. grandis x E. brassiana) x E. pellita) x (E. urophylla x (E. camaldulensis x E. grandis)).

Cabe mencionar também que os experimentos ora realizados trazem novas alternativas de avaliar a tolerância à seca em condições de campo. Foi possível observar que as progênies cultivadas em locais com acentuada restrição hídrica são caracterizadas por apresentarem mecanismos diversos em relação à morfologia foliar para tolerância à seca o que é devido, em larga escala, da hibridação dos materiais genéticos. Tais progênies adotam ainda diferentes mecanismos, incluindo alterações na largura e comprimento foliar, o que impacta a área foliar e área foliar específica. Registre-se, ainda, que os cruzamentos obtidos com o projeto são oriundos de materiais genéticos com reconhecida tolerância à seca e com adequada produtividade em condições de campo. Com efeito, todos os dados aqui obtidos podem e poderão contribuir para discriminação precoce de genótipos de Eucalipto mais tolerantes à seca.