

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

NÁGILA CAMPOS SILVA

**TROCAS GASOSAS, RELAÇÕES HÍDRICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM
CLONES DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2019**

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

T

S586t
2019
Silva, Nágila Campos, 1993-
Trocas gasosas, relações hídricas e composição bioquímica
em clones de eucalipto com tolerância diferencial à seca / Nágila
Campos Silva. – Viçosa, MG, 2019.
42 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Samuel Cordeiro Vitor Martins.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 37-42.

1. Secas. 2. Açúcar. 3. Déficit hídrico. 4. Fotossíntese.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.
II. Título.

CDD 22. ed. 551.5773

NÁGILA CAMPOS SILVA

**TROCAS GASOSAS, RELAÇÕES HÍDRICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM
CLONES DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA**

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

Orientador: Samuel Cordeiro Vitor Martins

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

NÁGILA CAMPOS SILVA

**TROCAS GASOSAS, RELAÇÕES HÍDRICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM
CLONES DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA**

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

APROVADA: 8 de agosto de 2019.

Dr. Wagner L. Araújo
(UFV)

Dr. Auxiliadora Oliveira Martins
(UFV)

Dr. Alice Pita Barbosa
(UFRGS)

Dr. Samuel Cordeiro Vitor Martins
(Orientador)
(UFV)

NÁGILA CAMPOS SILVA

**TROCAS GASOSAS, RELAÇÕES HÍDRICAS E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA EM
CLONES DE EUCALIPTO COM TOLERÂNCIA DIFERENCIAL À SECA**

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

APROVADA: 8 de agosto de 2019.

Nágila Campos Silva
Autora

Dr. Samuel Cordeiro Vitor Martins
Orientador

Agradecimentos

Agradeço à Deus pela possibilidade de aprender e evoluir como pessoa.

Aos meus pais, Sandra e Mário, por sustentarem junto comigo meus sonhos, e ao meu irmão, Alan, por ser meu exemplo nos estudos. Obrigada por toda a dedicação e amor de vocês.

À Universidade Federal de Viçosa e a Viçosa por todos os aprendizados e vivências nesses sete anos, que foram essenciais para o meu amadurecimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal pela infraestrutura e suporte.

Ao Projeto Tolerância à seca e a todas as empresas parceiras pela concessão dos clones de eucalipto para meu projeto.

Ao meu orientador Prof. Samuel Cordeiro Vitor Martins por compartilhar o conhecimento de forma tão humana. Obrigada pela paciência e por todo o suporte.

Aos membros da banca, pela prontidão e disponibilidade para colaborar com o meu projeto.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos os professores do Programa de Fisiologia Vegetal por contribuírem para a minha formação.

Ao Laboratório de Hidráulica em Plantas, em especial à Talitha Pereira, Luciana Soares, Moab Andrade, Leonardo Araújo e Cleiton de Paula, que me ajudaram diretamente na execução desse projeto.

À República Malagueta e a Julianna Xavier, que são o grande presente de Viçosa, vocês foram essenciais.

Ao meu namorado, João Paulo, por todo amor e carinho, você tornou essa caminhada mais leve e repleta de aprendizados.

A minha família e amigos que estiveram presentes, direta ou indiretamente, nessa nova conquista.

RESUMO

SILVA, Nágila Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2019. **Trocas gasosas, relações hídricas e composição bioquímica em clones de eucalipto com tolerância diferencial à seca.** Orientador: Samuel Cordeiro Vitor Martins.

Devido às mudanças climáticas globais, eventos de mortalidade de árvores estão cada vez mais recorrentes. Diante disso, a busca por bioindicadores para seleção precoce de genótipos tolerantes à seca é crucial. Dada a importância do eucalipto para o setor florestal, foram investigados os mecanismos fisiológicos de tolerância à seca em clones com tolerância diferencial ao déficit hídrico. Foram usados os clones VM01 (tolerante), CO1275 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível) crescidos em casa de vegetação em vasos de 20 L. Foi imposto déficit hídrico a 60% da capacidade de campo (seca moderada) por três meses, posteriormente as mesmas plantas tiveram a irrigação suspensa (seca severa) por 8 dias, e logo após foram reidratadas durante 15 dias e comparadas com as plantas mantidas na condição controle. Durante o período de seca moderada foram analisados o crescimento em altura, diâmetro do caule e número de ramos, parâmetros de relações hídricas e a caracterização fotossintética. Ao final de cada regime hídrico foram medidas as trocas gasosas, fluorescência da clorofila e coletas para análises bioquímicas foram realizadas. Os clones sob seca moderada apresentaram similar redução do crescimento e não foram observados ajustamentos osmótico e elástico. Foram encontradas diferenças no potencial fotossintético em que os clones CO1275 e I144 apresentaram os maiores e menores investimentos na quantidade de rubisco ativa e taxa máxima de transporte de elétrons. Além disso, foi clara a tendência de maior investimento em potencial fotossintético sob déficit hídrico, o que foi associado com maiores valores de fotossíntese observados após reidratação. Ambos regimes hídricos promoveram redução similar nas trocas gasosas, não havendo diferenças significativas entre os genótipos. Não houve redução do *pool* de carboidratos não-estruturais sob seca moderada e severa, mas foi identificado maior conversão de amido em sacarose, provavelmente para fins osmóticos. Houve plasticidade em resposta à seca dos teores de prolina e compostos fenólicos, em que os genótipos apresentaram diferentes estratégias. No entanto, dentre os parâmetros avaliados, não foram encontrados bioindicadores robustos para seleção de genótipos tolerantes.

Palavras-chave: açúcares, déficit hídrico, fotossíntese.

ABSTRACT

SILVA, Nágila Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2019.
Physiological basis of drought tolerance in eucalyptus clones. Adviser: Samuel Cordeiro Vitor Martins.

Due to global climate change, tree mortality events are increasing worldwide. Therefore, the search for bioindicators for early selection of drought tolerant genotypes is crucial. Given the importance of eucalyptus for the forestry sector, the physiological mechanisms of drought tolerance in clones with differential tolerance to water deficit were investigated. Clones VM01 (tolerant), CO1275 (tolerant), I144 (intermediate) and CNB16 (sensitive) grown in greenhouse in 20 L pots were used. Water deficit was imposed at 60% of field capacity for three months, subsequently the same plants had irrigation suspended for 8 days (severe drought), afterwards they were rehydrated for 15 days and compared with plants maintained in the control condition. During the first drought event (60% CC) growth in height, stem diameter and number of branches, water relations parameters and photosynthetic characterization were analyzed. At the end of each water regime, gas exchange, chlorophyll fluorescence were measured and biochemical analyzes were performed. The clones under moderate drought showed similar growth reduction and no osmotic and elastic adjustments were observed. Differences were found in photosynthetic potential in which clones CO1275 and I144 presented the largest and smallest investments in the amount of active rubisco and maximum electron transport rate. In addition, there was a clear trend towards higher investment in photosynthetic potential under water deficit, which was associated with the higher photosynthesis values observed after rehydration. Both water regimes similarly reduced gas exchange, with no significant differences between genotypes being found. There was no net decrease in the non-structural carbohydrate pool under moderate and severe drought, but a conversion of starch to sucrose was identified, probably for osmotic purposes. There was plasticity in response to drought of proline and phenolic compounds, with genotypes presenting different strategies. However, among the evaluated parameters, no robust bioindicators for selection of tolerant genotypes were found.

Key-words: sugars; water deficit; photosynthesis.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental.....	12
3.2 Crescimento vegetal e determinação da concentração de açúcares solúveis.....	15
3.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	14
3.4 Extração metanólica para análises de metabólitos	15
3.4.1 Determinação da concentração prolina	16
3.4.2 Determinação da concentração nitrato	16
3.4.3 Determinação da concentração proteínas solúveis totais.....	16
3.4.4 Determinação da concentração de amido	17
3.4.5	
3.4.6	
3.5 Extração dos compostos fenólicos.....	17
3.5.1 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	18
3.6 Determinação da peroxidação de lipídios	18
3.7 Curva Pressão x Volume.....	19
3.8 Delineamento experimental e análise estatística	20
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Crescimento, curva pressão-volume e curvas A/C.....	20
4.2 Potencial hídrico.....	23
4.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila.....	24
4.4 Metabólitos.....	26
6. CONCLUSÕES	39
5. DISCUSSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é a espécie florestal mais plantada mundialmente, com aproximadamente 22 milhões de hectares em 90 países, tendo sua produção destinada ao comércio de madeira maciça, fibra de celulose, papel e tecido (Saadaoui et al., 2017). No território brasileiro, a plantação de eucalipto ocupa a maior área quando comparada com outras áreas de árvores plantadas. De acordo com o relatório anual da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2017), em 2016, a área plantada de eucalipto foi de 5,67 milhões de hectares distribuídos, principalmente, nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Diante dessa extensão, o Brasil se destaca entre os principais produtores mundiais na produção de celulose e papel, ocupando, respectivamente, o segundo e o oitavo lugar.

O eucalipto é uma espécie perene, de folhas grossas e rígidas, de alta produtividade e adaptabilidade à diferentes condições climáticas (Whitehead e Beadle, 2004). No entanto, as mudanças climáticas em curso nos últimos anos, aumento da temperatura global e mudanças nos padrões pluviométricos (Lewis et al., 2011), vêm desencadeando prejuízos na produtividade florestal e relatos de mortalidade florestal têm sido observados no Brasil e Austrália (Fensham e Fairfax, 2007). As principais consequências da deficiência hídrica nas plantas arbóreas são o esgotamento de carbono e queda na condutividade hidráulica. O esgotamento de carbono ocorre quando o período de seca é longo o bastante para reduzir as taxas fotossintéticas, devido ao fechamento estomático, levando à depleção das reservas de energia na planta. As quedas na condutividade hidráulica relacionam-se mais com a intensidade da seca, que, caso severa o suficiente para aumentar a tensão nos vasos do xilema, pode promover cavitação (rompimento da coluna d'água) e embolismo (formação de bolhas de ar) (McCulloh e Sperry 2005; McDowell et al. 2008).

O menor conteúdo de água nas células vegetais em resposta à seca acarreta maior concentração de solutos. Contudo, pode também haver maior produção líquida de solutos osmocompatíveis (ajuste osmótico) como estratégia para redução do potencial osmótico celular (Whitehead & Beadle, 2004; Ngugi et al., 2003) e, por

consequente, do potencial hídrico, potencializando o gradiente de potencial hídrico entre planta-solo necessário para a absorção de água pelas raízes. Espécies de eucalipto apresentam comumente ajuste osmótico sob déficit hídrico, com diferentes variações na concentração de solutos, reduzindo seu potencial osmótico como também sua taxa de crescimento (Saadaoui et al., 2017). Merchant et al. (2007) mostraram que o potencial osmótico em plena turgescência e no ponto de perda de turgor em seis espécies de eucalipto diminuíram significativamente em resposta à seca. Além do ajuste osmótico, o ajuste da elasticidade da parede celular também contribui para a manutenção da hidratação e turgor dos tecidos foliares.

A elasticidade da parede celular é outro fator que as espécies de eucalipto podem ajustar sob seca e que pode variar de acordo com a morfologia dos tecidos foliares (Merchant et al., 2007). Sob seca, as folhas podem ajustar o módulo de elasticidade (ϵ) das células, geralmente aumentando a rigidez por meio da produção de paredes celulares menos elásticas. Esta resposta costuma ser acompanhada por alta sensibilidade estomática e rápida perda de turgor celular, configurando uma estratégia de manutenção do conteúdo de água da planta (Whitehead e Beadle, 2004). Entretanto, espécies de eucalipto podem também reduzir ϵ devido à formação de tecidos mais elásticos sob condição de seca resultando na manutenção da turgescência celular (Merchant et al., 2007).

Além dos ajustes osmótico e elástico, espécies de eucalipto sob restrição hídrica aumentam a proporção de raízes, reduzem a área foliar e apresentam menores condutância estomática e taxa fotossintética. Não obstante, evidências sugerem que o ajuste osmótico é um fator crucial para o equilíbrio dos processos fisiológicos, pois utiliza o excesso de energia (que poderia gerar espécies reativas de oxigênio (EROs)) para o acúmulo ativo de solutos. EROs são formadas em resposta ao acúmulo excessivo de poder redutor (NADPH) e ATP no estroma, ocorrendo quando as limitações à assimilação do CO₂ precedem a inativação das reações de transferência de elétrons nos cloroplastos. As EROs podem causar danos fotoinibitórios e fotooxidativos resultando em peroxidação de lipídeos, desnaturação de proteínas e mutação do DNA (Asada, 1999). O aldeído malônico (MDA) é subproduto da peroxidação lipídica e, por este motivo, ótimo indicador da ocorrência de estresse. Outros bons indicadores são os teores de compostos antioxidantes e avaliações das

proteínas envolvidas na proteção contra o estresse hídrico, glutamina sintetase, malato desidrogenase e isoflavona. Como observado em *Eucalyptus globulus*, a seca promoveu aumento da atividade da enzima dehidroascorbato redutase e dos teores do próprio ascorbato, na forma oxidada, evidenciando que o balanço redox das células é alterado durante situações de seca. Além disso, os teores de glutathione reduzida também aumentaram sob seca, mostrando a ativação de mecanismos antioxidantes durante a situação de estresse (Correia et al., 2016).

A dinâmica do conteúdo de carboidratos não estruturais (glicose, frutose, sacarose e amido) em resposta à seca é variável entre diferentes espécies lenhosas (Adams et al., 2017). Porém, espera-se que espécies com alta sensibilidade estomática e menor conteúdo intrínseco de reservas sejam mais sujeitas à depleção de reservas após episódios de seca prolongados (McDowell et al., 2008). No entanto, Mitchell et al. (2013) não observaram mudanças no conteúdo total de carboidratos em plantas de eucalipto sujeitas ao déficit hídrico letal. Estas observações apontam a falha hidráulica como causa provável da morte das plantas e não a inanição causada pela “fome de carbono”. Não obstante, é importante frisar que tal experimento foi conduzido na Tasmânia, Austrália, sob condições de clima temperado. Assim, em condições tropicais, a exposição às temperaturas elevadas pode exacerbar as taxas respiratórias e fotorrespiratórias, fornecendo condições para a depleção das reservas de carboidratos.

Em resumo, ajustes em parâmetros de relações hídricas, melhor sistema antioxidante e maior razão sistema radicular/parte aérea parecem ser características predominantes em espécies de eucalipto tolerantes à seca (Hodecker et al., 2018). No entanto, grande parte das informações disponíveis, principalmente aquelas referentes aos ajustamentos osmótico e elástico, foram obtidas em espécies de eucalipto diferentes (*E. globulus*, por exemplo) daquelas plantadas no Brasil (McKiernan et al., 2015), onde predomina o plantio de clones e híbridos de *E. grandis* e *E. urophylla*. Portanto, faz-se necessário avaliar materiais plantados e adaptados às nossas condições tropicais para acessar a generalidade das características até então associadas à tolerância ao déficit hídrico em eucalipto.

Etapa fundamental para o sucesso das avaliações é a escolha de materiais que possuam tolerância diferencial à seca observada em plantas adultas, sob condições de campo e expostas à seca natural. O longo período de seca ocorrido entre os anos de 2013 e 2015 causou enorme prejuízo no setor florestal, mas também permitiu às empresas deste setor a seleção de vários clones com desempenho contrastante frente à seca. Através de iniciativa estabelecida com a UFV surgiu o Projeto Tolerância à seca, em que várias empresas doaram os seus melhores materiais com o intuito de promover avanços no melhoramento genético e compreensão dos mecanismos que garantem uma maior tolerância à seca na espécie.

Diante do exposto, realizamos a avaliação de vários mecanismos envolvidos na tolerância à seca. Visou-se compreender se existe um conjunto intrínseco de características, expressas ainda no estágio juvenil, que separam os clones tolerantes dos sensíveis, podendo ser utilizadas para direcionar a seleção de novas progênies em programas de melhoramento.

2. OBJETIVOS

Compreender os mecanismos fisiológicos da tolerância à seca em clones de eucalipto.

Entender o papel da condutância estomática, dos ajustes osmótico e elástico, e dos metabólitos básicos em clones de eucalipto sob déficit hídrico.

Identificar biomarcadores para seleção de genótipos tolerantes à seca.

3.1

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, condições de cultivo e desenho experimental

O experimento foi conduzido em Viçosa (20°45'S, 42°54'W, altitude de 650 m), Minas Gerais, na casa de vegetação do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Em experimento prévio, a partir de 12 materiais cedidos pelas empresas, foram escolhidos os seguintes clones: VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*) tolerante, CO1275 (*Eucalyptus camaldulensis*) tolerante, I144 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) intermediário e CNB16

(*Eucalyptus urophylla*) sensível. Mudanças desses materiais foram cedidas pelas empresas parceiras do projeto Tolerância à Seca e transplantadas para vasos de 20 litros, contendo uma mistura de solo e areia.

As mudas foram cultivadas em dois regimes de irrigação: 100 e 60% da capacidade de campo (CC), constituindo os tratamentos 'controle' e 'seca moderada'. O tratamento de seca moderada foi aplicado após quatro meses, reduzindo a CC gradualmente (reduções de 5%) até chegar à condição de 60% da CC. Para o ajuste da umidade do solo, foram realizadas medições diárias da umidade do solo com o medidor de umidade do solo WET-2 Sensor (Delta-T Devices, London, UK). Esses valores foram corrigidos através de uma regressão entre umidade real x umidade do aparelho, calculando-se a quantidade de água necessária por vaso. A condição de seca foi mantida até que quantidade suficiente de folhas fossem formadas para proceder com as análises, então, a irrigação foi suspensa por 8 dias, até que sinais de murcha ou dano foliar se tornaram aparentes. Posteriormente, as plantas foram irrigadas à 100% CC e as análises foram feitas após 15 dias de reidratação.

As plantas foram fertilizadas mensalmente, com macro e micronutrientes, aplicando-se 200 mL de solução por vaso. Após a instalação do experimento, as avaliações iniciaram-se a partir da emissão das primeiras folhas desenvolvidas após a aplicação dos tratamentos. As avaliações e amostragens foram realizadas em folhas completamente expandidas, localizadas na quarta e quinta folhas a partir do ápice dos ramos.

3.2 Os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram avaliados duas vezes ao longo do dia: 08:00-09:00 h e 11:30-12:30 h. Para as análises bioquímicas os tecidos foliares foram coletados entre 11:30-12:30 h, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, até a realização das análises.

Crescimento vegetativo

Após dois meses de crescimento, foram realizadas avaliações de crescimento em altura (cm), diâmetro do caule (mm) e número de ramos semanalmente por 77 dias. Nos primeiros 21 dias as plantas estavam na condição controle e no restante, a partir da imposição da seca moderada.

Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

3.3 Parâmetros de trocas gasosas foram determinados simultaneamente com medições de fluorescência da clorofila (*Chl a*), utilizando-se de sistema de trocas gasosas (LI-6400XT) equipado com câmara integrada de fluorescência (LI-6400-40, LI-Cor Lincoln, EUA). A taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática (*g_s*) e concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) foram medidas sob radiação fotossinteticamente ativa (*RFA*), 1000 μmol (fótons) m⁻² s⁻¹.

Para determinação dos parâmetros de fluorescência da *Chl a*, folhas foram previamente adaptadas ao escuro, por 30 minutos. Os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante (0,03 μmol m⁻² s⁻¹) para determinação da fluorescência inicial (*F₀*). Em seguida, pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 μmol (fótons) m⁻² s⁻¹ e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (*F_m*) e procedeu-se à estimação da eficiência fotoquímica máxima do FSII (*F_v/F_m*). Também foi determinado o estado estacionário do rendimento de fluorescência (*F_s*), obtido após pulso de luz branca saturante (8000 μmol m⁻² s⁻¹; 0,8 s) para obter-se a fluorescência máxima do tecido foliar adaptado à luz (*F_m'*). A luz actínica foi então desligada e iluminação vermelho-distante foi aplicada (2 μmol m⁻² s⁻¹) para medir a fluorescência inicial do tecido foliar adaptado à luz (*F₀'*). A eficiência fotoquímica atual do fotossistema II (*φ_{FSII}*) foi determinada seguindo os procedimentos de Genty et al. (1989). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi calculada pela equação: $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot Abs_{folha} \cdot 0,5$ (Bilger et al., 1986), em que *Y_{II}* é o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII, $Y_{II} = (F_m' - F) / F_m'$, com fluorescência em amostra adaptada a luz antes do pulso de saturação (*F*); *PAR* é o fluxo de fótons (μmol m⁻² s⁻¹) incidente sobre a folha; 0,5, o valor correspondente a fração de energia de excitação distribuída para o FSII; e *Abs_{folha}*, o valor correspondente a fração de luz absorvida pelas folhas.

Curvas de variação da *A* em função da concentração interna de CO₂ (*A/C_i*) foram obtidas sob irradiância saturante e não fotoinibitória de 1000 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, variando-se a concentração de CO₂, de 50 a 1600 μmol mol⁻¹ (Long e Bernacchi, 2003). Curvas similares também foram realizadas em folhas mortas por fervura, corrigindo-se assim os valores de *A* e *C_i*, em função de vazamentos de CO₂ da câmara

de medição do analisador de gases, conforme Flexas et al. (2007). A partir das curvas A/C_i , foram calculados taxa máxima de carboxilação pela Rubisco (V_{cmax}), taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (J_{max}) e taxa de respiração na presença de luz. As curvas A/C_i foram ajustadas utilizando-se técnicas de regressão não-linear, baseadas nas equações de Farquhar et al. (1980), modificadas por Sharkey (1985) e Harley e Sharkey (1991). Para tal, foram utilizados os parâmetros de cinética da RuBisCO descritos em Martins et al. (2013).

Extração metanólica para análises de metabólitos

3.4 Alíquotas de aproximadamente 15 mg de material vegetal liofilizado (folha) foram adicionadas com 700 μ L de metanol a 100% (-20 °C) e agitados durante 10 seg. Posteriormente, foram agitados por 20 minutos, 80 °C, 750 rpm e centrifugados por 15 minutos, 4 °C, 13500 rpm. O sobrenadante foi transferido para um eppendorf de 2mL, do qual 40 μ L foram retirados para a quantificação de pigmentos. Posteriormente, foram adicionados 375 μ L de $CHCl_3$ + 750 μ L de ddH₂O ao sobrenadante e agitados por 10 seg. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos, 13500 rpm, 4 °C. A fase superior (polar, transparente) foi então transferida para outro eppendorf, sendo então utilizada para quantificação de açúcares, aminoácidos e nitrato e prolina. O pellet foi utilizado para a quantificação de proteínas e amido.

3.4.1

Determinação da concentração de açúcares solúveis

As concentrações de glicose, frutose e sacarose foram determinadas segundo metodologia de Fernie et al. (2001). Alíquota de 10 μ L de extrato metanólico + 40 μ L de H₂O foram adicionados em 160 μ L do tampão de quantificação (contendo 150 μ L de tampão HEPES/KOH 0,1 M pH 7,0, MgCl₂ 3 mM, 5 μ L de ATP 60 mg/mL, 5 μ L de NADP⁺ 36 mg/mL e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato (G6PDH)). Essa solução foi avaliada no comprimento de onda de 340 nm até estabilizar a OD (aprox. 10 - 15 minutos). Em seguida, foram adicionados, sucessivamente, 5 μ L das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 40 minutos entre cada aplicação e 1 minuto de intervalo entre cada leitura. Para estimar a concentração da glicose, frutose e sacarose, foi utilizado a seguinte equação, baseada na lei de Lambert-Beer " μ mol NADPH = Δ OD / (2,85*6,22)" e os resultados foram expressos em mmol g⁻¹ MS. O

conteúdo total de carboidratos não-estruturais foi determinado pela soma dos teores de glicose, frutose, sacarose e amido, e os resultados expressos em mg g^{-1} MS.

Determinação da concentração de aminoácidos totais

A determinação da concentração de aminoácidos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yemm e Cocking (1995). 50 μL de extrato metanólico foram adicionados à 50 μL de tampão citrato de sódio 1M, pH 5,2 contendo 2% de ácido ascórbico e 100 μl ninhidrina. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$ e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 570 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de leucina (1 mM). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

Determinação da concentração prolina

3.4.3 A determinação da concentração de prolina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shabnam (2016). 50 μL de extrato metanólico foram adicionados à 200 μL de solução ácida de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético 17 glacial; 20 mL de ácido fosfórico 6M). As amostras foram incubadas por 60 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$ e, em seguida a reação foi paralisada em banho de gelo. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 520 nm e as absorbâncias comparadas à curva-padrão de prolina (1 mM). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

Determinação da concentração nitrato

A determinação da concentração de nitrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita em APHA (2005). Alíquotas de 5 μL de extrato metanólico foram completadas para 300 μL com H_2O ultrapura e lidas em triplicatas nos comprimentos de onda de 210, 220 e 230 nm. A partir das OD obtidas, calcula-se a segunda derivada (($\text{OD}_{210}-\text{OD}_{220}$)-($\text{OD}_{220}-\text{OD}_{230}$)). As absorbâncias comparadas à curva-padrão de KNO_3 . Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

Determinação da concentração proteínas solúveis totais

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada segundo Bradford (1976). O precipitado resultante da extração metanólica foi ressuspendido em 400 μL

de NaOH 0,1 M. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 95 °C sob agitação e após, centrifugadas por 5 minutos a 13500 rpm, sob temperatura de 4 °C. Uma alíquota de 5 µL do sobrenadante foi adicionada a 250 µL da solução do reagente de Bradford (Bradford, 1976) e, posteriormente lida no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas solúveis nas amostras foi determinada utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos em mg g⁻¹ MS.

Determinação da concentração de amido

A concentração de amido foi determinada no pellet resultante da extração metanólica, segundo Fernie et al. (2001). Aos tubos contendo o NaOH 0,1 M utilizado na quantificação de proteínas, foram adicionados 70 µL de ácido acético 1 M, seguido de agitação. Uma alíquota de 5 µL de extrato + 35 µL de H₂O foram combinados com 60 µL do mix de hidrólise do amido, composto por tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,9 e pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades µL⁻¹) e α-amilase (0,01 U µL⁻¹). As amostras foram incubadas *overnight*, 37 °C, sob agitação a 500 rpm. Em seguida, uma alíquota de 10 µL dessa reação + 40 µL de H₂O foram combinadas com 160 µL do tampão de quantificação (150 µL de tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0, MgCl₂ 30 mM, 5 µL de ATP 60 mg mL⁻¹, 5 µL de NADP⁺ 36 mg mL⁻¹ e 0,58 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato dependente de NADP⁺ (G6PDH)). Essa nova reação foi lida no comprimento de onda de 340 nm até estabilização da densidade optica (OD), momento em que foram adicionados 5 µL de hexocinase (2 U/reação). As leituras a 340 nm continuaram por mais 60 minutos, com 1 minuto de intervalo entre cada leitura. A concentração de amido foi estimada indiretamente pela quantidade de glicose resultante da sua degradação e os resultados calculados por meio da equação “µmol NADPH = ΔOD / (2,85*6,22)” e expressos em mmol de glicose equivalente g⁻¹ MS.

Extração dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram extraídos utilizando 15 mg de amostra seca em tubos de 2 mL, no qual foi adicionado 200 µL de clorofórmio (100%) + 400 µL de metanol (100%), homogeneizados com o auxílio de um Vórtex e, posteriormente, agitadas durante 15 minutos, 25 °C, 750 rpm. Em seguida, foi adicionado 200 µL de

clorofórmio (100%) seguido de homogeneização utilizando-se o Vórtex e centrifugadas por 20 minutos, 25 °C, 4000 rpm para a coleta do sobrenadante. Ao pellet, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (100%) + 400 µL de metanol (100%), homogeneizados com o auxílio de um Vórtex, e centrifugados por 15 minutos em 25 °C, 4000 rpm, no qual retirou-se o sobrenadante e adicionou ao anterior adicionando 400 µL de H₂O, que em seguida foram centrifugados por 15 minutos, 25 °C, 4000 rpm (Singleton e Rossi, 1965).

Determinação dos compostos fenólicos totais

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia proposta por Shahidi e Naczk (1995). Para a construção da curva analítica, foi utilizado solução padrão de ácido tânico. Para determinar a concentração dos compostos fenólicos (nas soluções padrão e amostras), foi retirada uma alíquota de 7,5 µL, estes foram transferidas para placa protegidos da luz com papel alumínio, em seguida, adicionamos 67,5 µL de água destilada, 37,5 µL do reagente Folin Ciocalteu, 187,5 µL de solução saturada de Na₂CO₃ (20%) e deixadas por 40 minutos, 25 °C em repouso ao abrigo da luz. Após, as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro UV-visível foram realizadas à 725 nm. Para o branco, todos os reagentes foram adicionados exceto as soluções padrão ou as amostras.

3.6 Através da equação da curva de calibração e com os valores das absorvâncias das amostras, o cálculo do teor de compostos fenólicos totais, expresso em µg de ácido tânico mg⁻¹ MS.

Determinação da peroxidação de lipídios

A intensidade da peroxidação de lipídios foi estimada pela concentração de aldeído malônico (MDA), por meio de teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Heath e Packer (1968). Amostras de 10 mg de folhas maceradas foram extraídas com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v e centrifugadas a 10000 g por 15 minutos, a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante para outro tubo, e repetiu-se a operação anterior, juntando-se os sobrenadantes. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada em um meio de reação com 1,5

mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos contendo as amostras e o meio de reação foram fechados e incubados em banho-maria por 95° C, durante 25 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi paralisada em banho de gelo por 10 minutos, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por mais 10 minutos a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Hitachi, modelo U-5100) no comprimento de onda de 532 nm em triplicatas. A absorbância inespecífica foi obtida em 600 e 400 nm e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Hodges et al., 1999), sendo os resultados expressos em nmol g⁻¹ MS.

Curva Pressão x Volume

3.7 Para a construção das curvas pressão-volume (curvas PV) (Sack et al., 2012), folhas foram coletadas ao final da tarde e seus respectivos pecíolos imersos em água destilada por, no mínimo, 12 h. Após esse período de reidratação, procedeu-se à medida do potencial hídrico inicial (Ψ_0). As folhas foram imediatamente pesadas numa balança digital e perderam água na bancada até atingirem uma redução de 1% no TRA e peso medidos novamente. Medições foram repetidas até que a relação entre o inverso do potencial hídrico e o teor relativo de água se tornasse estritamente linear, o que indica que a turgescência foi perdida e, assim, as variações no Ψ_{folha} passaram a ser governadas tão somente por mudanças no potencial osmótico, ou seja, sem contribuições do potencial de pressão. No final das medições, as folhas foram secas a 70 °C, até massa constante, para obter suas massas secas. A partir das curvas PV, foram estimados o potencial osmótico em turgescência plena (Ψ_0) e no ponto de perda de turgescência (Ψ_{PPT}), conteúdo relativo de água na folha no ponto de perda de turgescência (CRA_{PPT}), o conteúdo saturado de água (CSA), o conteúdo de água no simplasto (CAS), a capacitância foliar (CF) e o módulo global de elasticidade (ϵ). O CSA aqui apresentado foi obtido por meio da razão entre massa de água na saturação (estimado a partir da extrapolação entre 'massa de água' (g) e potencial hídrico (MPa)) e a massa seca foliar (g). Os valores de CF foram calculados a partir do início da curvatura da relação entre potencial hídrico (MPa) e TRA (%), expressos em termos absolutos e normalizados pela área foliar. Para isso, a seguinte equação foi utilizada:

$$CF = \Delta TRA / \Delta \Psi_{\text{folha}} (MS/Af) (MA/MS) / M8$$

Em que MS é a massa seca foliar (g), Af é a área foliar unitária (m²), MA é a massa de água na folha a 100% do TRA (g) e M é a massa molar da água (g mol⁻¹). Foram obtidos os valores de capacitância foliar em turgescência plena (C_{TP}) e após o ponto de perda de turgescência (C_{PPT}).

Delineamento experimental e análise estatística

3.8 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em um fatorial 2x4, com cinco repetições. Os fatores foram constituídos por dois níveis de irrigação controlando-se a capacidade de campo dos vasos (100% e 60% da capacidade de campo) e quatro genótipos, com diferentes sensibilidades à seca, totalizando oito tratamentos e 40 unidades experimentais. Os efeitos das variáveis foram submetidos ao método LSD (diferença mínima significativa), P valor < 0.05, utilizando-se o software SAS 9.1.3.

4. RESULTADOS

4.1 Crescimento, curvas pressão-volume e curvas A/C_i

Os clones apresentaram altura inicial semelhante, mas diferiram principalmente quanto ao diâmetro do caule e número de ramos, em que os clones VM01 e CO1275 apresentaram os maiores e menores valores para estas variáveis, respectivamente. Com quatro meses de idade, metade das plantas foram submetidas ao tratamento de seca moderada (60% CC) em que todos os clones tiveram altura inferior de aproximadamente 50 cm quando comparados com os controles. Quanto ao diâmetro do caule, não houve efeito do déficit hídrico nos clones CO1275 e I144, ao passo que os clones CNB16 e VM01 tiveram redução de 9 e 16%, respectivamente. A seca moderada reduziu (entre 7 a 20%) o número de ramos em todos os clones (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento em altura, diâmetro e número de ramos dos clones de eucalipto VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível) na condição controle (100% CC) e seca moderada (60% CC) medidas semanalmente durante 77 dias. Médias seguidas do erro-padrão. Asterisco denota diferença dentro da mesma condição para cada clone. Erro-padrão seguidos por letras maiúsculas diferem os clones dentro da mesma condição para a mesma variável. Ausência de letras denota diferença não significativa. Teste LSD ($P < 0,05$)

Clone	Condição	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Nº ramos
VM01	Controle	256 ± 8.7	25 ± 0.4A	45 ± 1.2
	Seca	206 ± 13.3*	21 ± 0.7*A	37 ± 1.9*
CO1275	Controle	251 ± 7.3	15 ± 1.6B	34 ± 3.9
	Seca	195 ± 5.8*	15 ± 1.6B	27 ± 0.6*
I144	Controle	239 ± 4.9	23 ± 0.5A	31 ± 0.7
	Seca	202 ± 7.9*	22 ± 0.5A	29 ± 1.3*
CNB16	Controle	258 ± 10.3	22 ± 0.6A	48 ± 1.9
	Seca	198 ± 8.3*	20 ± 0.5*A	42 ± 1.5*

Dentre os parâmetros obtidos a partir das curvas pressão-volume, apenas dois parâmetros responderam ao efeito do déficit hídrico, o conteúdo de água no simplasto (CAS) e o potencial hídrico foliar no ponto de perda de turgor (Ψ_{PPT}). O CAS foi 30% menor sob déficit hídrico nos clones VM01, I144 e CNB16. Sob condições controle, os clones não diferiram quanto ao valor de CAS ($87\% \pm 2,5$), porém, como o CAS do clone CO1275 não respondeu ao déficit hídrico, este clone apresentou o maior valor de CAS nesta condição ($94\% \pm 2,7$). Quanto ao Ψ_{PPT} , apenas o clone I144 apresentou valor significativamente menor sob déficit hídrico (-1,7 MPa) em relação ao controle (-1,5 MPa). Por outro lado, houve diferença genotípica no parâmetro, em que os clones VM01, CNB16 e I144 apresentaram os menores valores em ambos regimes hídricos ($-1,6 \text{ MPa} \pm 0,08$) e o clone CO1275, os maiores valores (-1,3 MPa).

Não foram detectados ajustamentos elástico e osmótico nos clones. O Ψ_0 apresentou baixa variabilidade genotípica em ambos regimes hídricos (-1,1 a -1,4 MPa), ao passo que maior variabilidade foi encontrada para o ϵ , porém apenas sob déficit hídrico, com o clone CO1275 com maior valor (10,8 – menos elástica) e o CNB16 menor valor (7,5 – mais elástica). A CF também não foi respondente ao déficit hídrico, sendo maior no clone CO1275 ($0,65 \text{ mol m}^{-2} \text{ MPa}^{-1}$) e menor nos demais clones ($0,45 \text{ mol m}^{-2} \text{ MPa}^{-1}$) (Tabela 2)

Tabela 2. Parâmetros da curva pressão x volume na condição controle (100% CC) e seca moderada (60% CC). CSA, conteúdo saturado de água (mg/MS); Ψ_o , potencial osmótico em turgescência plena (MPa); Ψ_{PPT} , potencial hídrico foliar no ponto de perda de turgescência (MPa); CRA_{PPT} , conteúdo relativo de água na folha no ponto de perda de turgescência (%); ϵ , módulo de elasticidade da parede celular corrigido pela quantidade de água presente no apoplasto (MPa); CAS, conteúdo de água no simplasto; CF, capacitância foliar ($\text{mol m}^{-2} \text{MPa}^{-1}$). Clones VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). Médias seguidas do erro-padrão. Asterisco denota diferença dentro da mesma condição para cada clone. Erro-padrão seguidos por letras maiúsculas diferem os clones dentro da mesma condição para a mesma variável. Ausência de letras denota diferença não significativa. Teste LSD ($P < 0,05$)

Variáveis	VM01		CO1275	
	Controle	Seca	Controle	Seca
CSA	2,8 ± 0,08A	2,6 ± 0,13A	2,9 ± 0,05A	2,5 ± 0,16A
Ψ_o	-1,3 ± 0,04A	-1,4 ± 0,0A	-1,1 ± 0,02B	-1,2 ± 0,08B
Ψ_{PPT}	-1,6 ± 0,03A	-1,8 ± 0,03A	-1,3 ± 0,05C	-1,4 ± 0,09B
CRA_{PPT}	82,9 ± 2,50A	86,9 ± 1,21A	84,7 ± 2,06A	82,8 ± 3,54A
E	10,7 ± 0,94	9,1 ± 1,48AB	11,5 ± 0,81	10,8 ± 1,49A
CAS	84,8 ± 6,51	60,9 ± 10,09B*	93,9 ± 1,71	94,3 ± 2,74A
CF	0,5 ± 0,08B	0,5 ± 0,04B	0,7 ± 0,05A	0,6 ± 0,08A
Variáveis	I144		CNB16	
	Controle	Seca	Controle	Seca
CSA	2,6 ± 0,15AB	2,3 ± 0,12AB	2,3 ± 0,14B	2,1 ± 0,07B
Ψ_o	-1,2 ± 0,03A	-1,3 ± 0,10A	-1,3 ± 0,05A	-1,3 ± 0,04A
Ψ_{PPT}	-1,5 ± 0,03B	-1,7 ± 0,10A*	-1,6 ± 0,07A	-1,7 ± 0,03A
CRA_{PPT}	87,6 ± 0,97A	87,7 ± 0,61A	84,3 ± 0,85A	86,7 ± 0,54A
E	11,5 ± 0,21	8,6 ± 1,28AB	10,4 ± 0,58	7,5 ± 0,93B
CAS	82,2 ± 6,07	63,2 ± 8,21B*	86,5 ± 3,33	61,4 ± 6,35B*
CF	0,4 ± 0,05B	0,4 ± 0,03B	0,5 ± 0,03B	0,5 ± 0,02B

A análise das curvas A/C_i indicou que os genótipos possuem semelhante V_{cmax} quando submetidos ao déficit hídrico. No entanto, foi notável a tendência de menor V_{cmax} dos clones VM01 e I144 quando irrigados. Essa resposta é reforçada quando observados os valores de J_{max} , que são menores nas plantas controle dos clones VM01 e I144. A comparação genotípica indica que todos os clones possuem semelhante V_{cmax} , mas o clone I144 apresenta os menores valores de J_{max} . Em relação aos dados de respiração mitocondrial, o clone CNB16 foi o que apresentou os maiores valores nos controles, sendo o único clone que respondeu à imposição do déficit hídrico apresentando redução de R_{dark} (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de trocas gasosas na condição controle (100% CC) e seca moderada (60% CC), V_{cmax} , velocidade máxima de carboxilação da rubisco ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); J_{max} , taxa máxima de transporte de elétrons ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); R_{day} , taxa respiratória na luz estimada pela curva A/C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); R_{dark} , taxa respiratória no escuro ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$). Clones VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). Médias seguidas do erro-padrão. Asterisco denota diferença dentro da mesma condição para cada clone. Erro-padrão seguidos por letras maiúsculas

diferem os clones dentro da mesma condição para a mesma variável. Ausência de letras denota diferença não significativa. Teste LSD ($P < 0,05$)

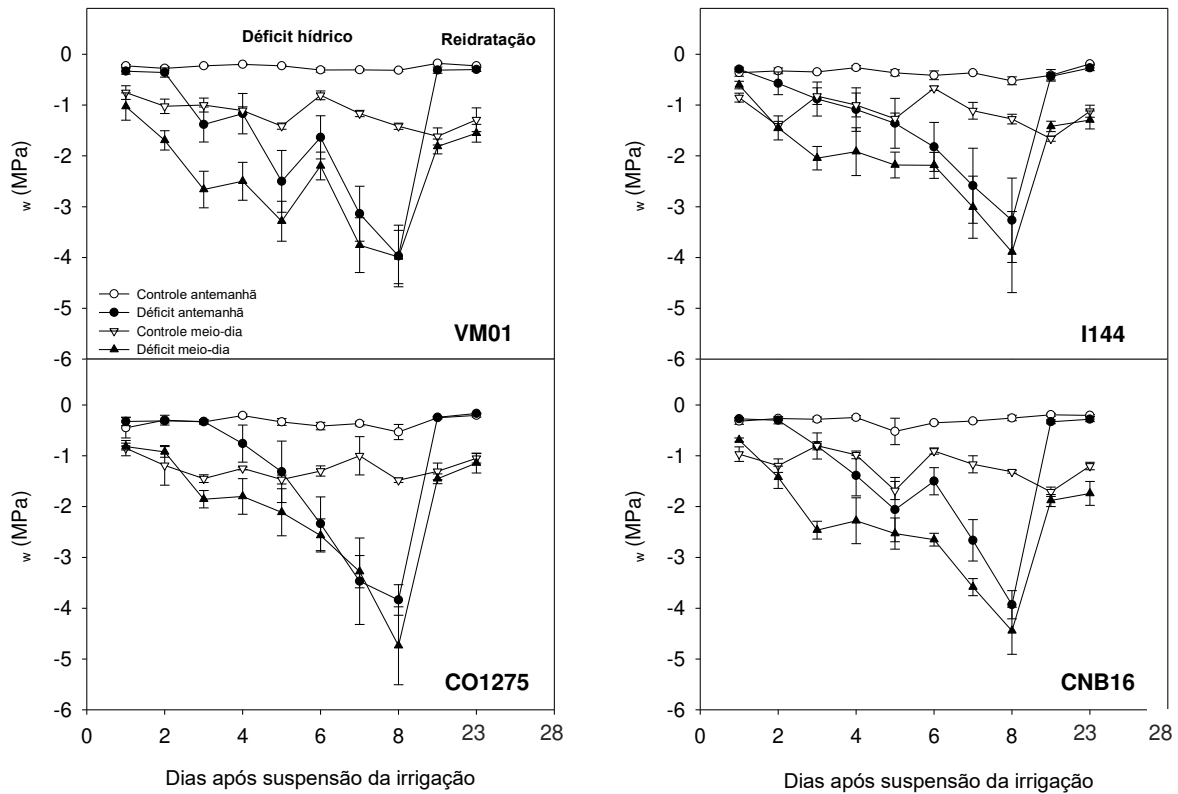
Variáveis	VM01		CO1275	
	Controle	Seca	Controle	Seca
V_{cmax}	50,8 ± 2,56	62,9 ± 6,27	58,9 ± 7,27	62,9 ± 4,81
J_{max}	84,3 ± 4,09B	103,4 ± 6,24AB*	105,3 ± 13,88A	113,3 ± 7,16A
R_{day}	0,8 ± 0,13C	1,3 ± 0,26B	1,1 ± 0,15B	1,3 ± 0,23A
R_{dark}	1,1 ± 0,15B	0,98 ± 0,10B	1,3 ± 0,12B	1,3 ± 0,03A

Variáveis	I144		CNB16	
	Controle	Seca	Controle	Seca
V_{cmax}	43,9 ± 4,98	60 ± 4,99*	54,9 ± 5,21	62,2 ± 4,70
J_{max}	67,2 ± 6,48C	89,8 ± 6,63B*	88,1 ± 4,32AB	100,9 ± 4,00AB
R_{day}	0,9 ± 0,29BC	0,9 ± 0,14A	1,1 ± 0,03A	1,3 ± 0,16A*
R_{dark}	1,3 ± 0,32B	1,4 ± 0,02A	1,9 ± 0,15A	1,3 ± 0,29A*

Potencial hídrico

4.2 As plantas que se encontravam sob seca moderada (60% CC) apresentaram valores de potencial hídrico (Ψ_w) na antemanhã (-0,31 MPa ± 0,01) e ao meio-dia (-0,79 MPa ± 0,09), semelhantes aos das plantas controle. Com sete dias de suspensão da irrigação, o Ψ_w na antemanhã se igualou ao do meio-dia no clone CO1275 (-3,4 MPa), e no oitavo dia no clone VM01 (-3,9 MPa). Antes da reidratação, todos os clones foram expostos a um Ψ_w de pelo menos -4 MPa (seca severa) e apresentaram desfolha, perdendo principalmente as folhas mais velhas. Após 15 dias da reidratação, todos os clones recuperaram os valores de Ψ_w , apresentando valores na antemanhã e ao meio-dia semelhantes aos seus respectivos controles (Figura 1).

Figura 1. Curso do potencial hídrico (Ψ_w) na antemanhã e ao meio-dia em função dos dias após suspensão da irrigação. Aos oito dias de suspensão ocorreu a reidratação das plantas (parte cinza) e o experimento continuou por mais 15 dias. Clones VM01 – tolerante, CO1275 – tolerante, I144 – intermediário e CNB16 – sensível. Barras representam o erro padrão da média

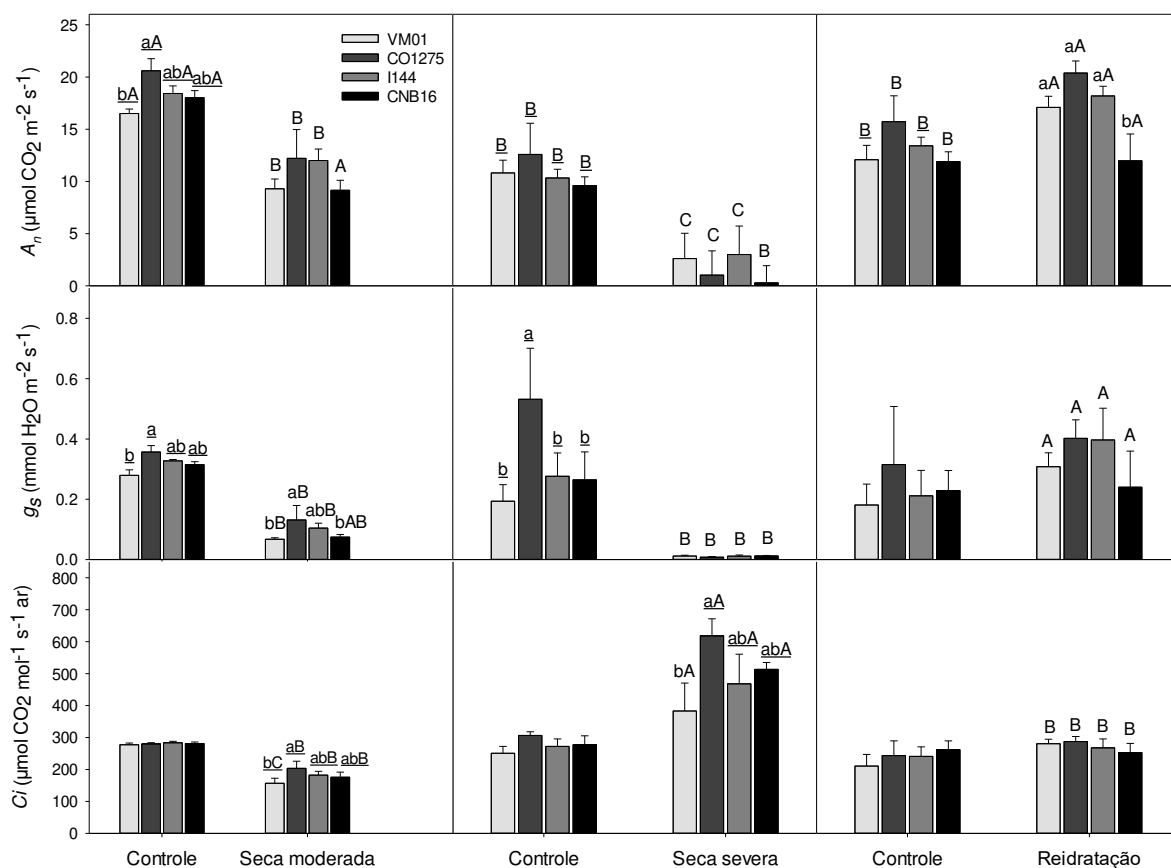


4.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

A análise de trocas gasosas demonstrou que os clones responderam de forma similar à imposição dos níveis moderado e severo de déficit hídrico, não havendo diferenças genotípicas na atividade fotossintética ou no comportamento estomático frente à seca. Sob seca moderada, a g_s mostrou reduções mais significativas (-70%) do que a A_n (-40%), evidenciando aumento na eficiência no uso da água. Por outro lado, sob seca severa, houve drástico fechamento estomático ($g_s < 0,01 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em que os clones apresentaram valores negativos de A_n e C_i maior do que a concentração ambiente de CO_2 ($> 400 \mu\text{mol mol}^{-1}$). O período de reidratação de 15 dias foi suficiente para a recuperação dos valores de A_n e g_s , com destaque para os clones VM01 e I144, em que os valores de A_n foram ainda superiores (+40%) àqueles observados nos controles (Figura 2).

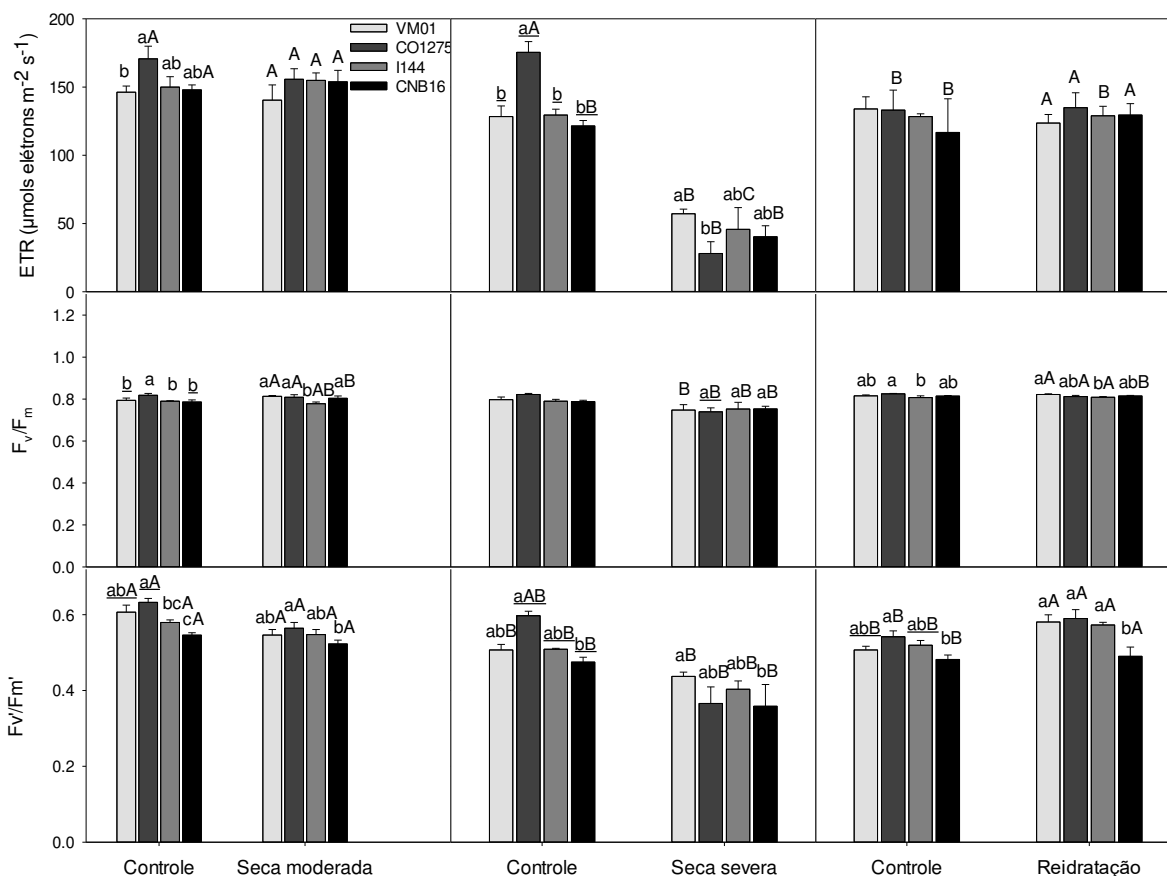
Figura 2. Variáveis fotossintéticas relacionadas às trocas gasosas em clones de eucalipto, VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). A_n , fotossíntese líquida; g_s , condutância estomática e C_i , concentração interna de CO_2 nas condições de seca moderada, seca severa e reidratação. Letra sublinhada denota diferença entre controle e déficit hídrico dentro da mesma época e mesmo clone. Letras minúsculas indicam diferenças entre os clones dentro da mesma condição hídrica e mesma época. Letras maiúsculas indicam diferenças entre épocas dentro de uma mesma condição hídrica e mesmo clone. Ausência de letras denota diferença não significativa. As

épocas foram consideradas como os períodos de seca moderada, seca severa e reidratação. Teste LSD ($P < 0,05$)



Não foram observadas limitações fotoquímicas no decorrer do experimento, com a razão F_v/F_m sempre se mantendo próxima a 0,8. Foi observada redução em ETR somente sob seca severa, com variação de 25 a 50 $\mu\text{mol e}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto nos controles esses valores se mantiveram acima de 125 $\mu\text{mol e}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Sob seca moderada, a razão F_v'/F_m' foi menor nos clones VM01 e CO1275, não diferindo dos controles nos demais clones. Os menores valores (0,35) da razão F_v'/F_m' foram observados sob seca severa nos clones CO1275, I144 e CNB16 enquanto os respectivos controles apresentavam valores superiores a 0,45; ressalta-se o clone VM01, no qual razão F_v'/F_m' foi igual ao valor do controle. Na reidratação, os valores da razão seguiram o comportamento observado para A_n , em que os clones VM01 e I144, que havia apresentando maior A_n , apresentaram os maiores valores da razão F_v'/F_m' (Figura 3).

Figura 3. Variáveis fotossintéticas relacionadas a fluorescência da clorofila a em clones de eucalipto, VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). ETR, taxa de transporte de elétrons; F_v/F_m , rendimento quântico máximo do PSII; F_v'/F_m' , eficiência máxima dos centros de reação quando abertos nas condições de seca moderada, seca severa e reidratação. Dados estatísticos conforme Figura 2



4.4

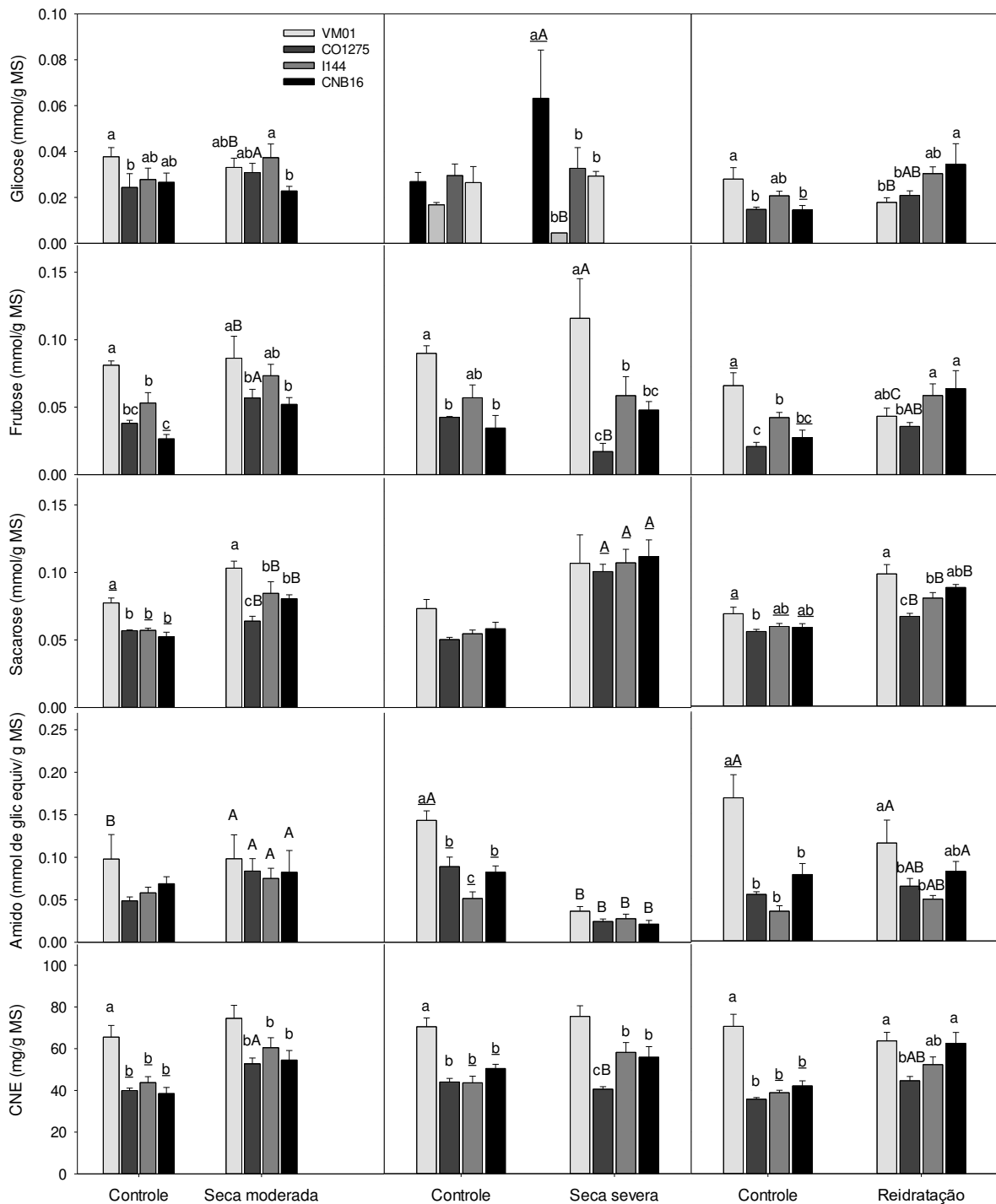
Metabólitos

A concentração de açúcares solúveis (glicose + frutose + sacarose) foi estável em todos os clones durante as diferentes épocas de coleta na condição controle, destacando-se o clone VM01 que sempre apresentou os maiores valores individuais nestes metabólitos em relação aos demais clones. Não houve um padrão consistente para as alterações em glicose e frutose sob seca moderada/severa e na reidratação. Por outro lado, a concentração de sacarose foi sempre maior nos clones I144 e CNB16 sob seca moderada (50%), severa (83%); e mesmo após a reidratação (50%) em relação aos respectivos controles, que apresentaram valor médio de 0,06 mmol sacarose/g MS (Figura 4).

O teor de amido nas folhas não foi modificado frente à seca moderada, em que os clones não diferiram entre si e mantiveram-se semelhantes ao controle ($0,08 \pm 0,006$ mmol de glicose equivalente/g MS). No entanto, a seca severa reduziu o conteúdo de amido de todos os clones, com redução de 50% no clone CNB16, e de 30% nos demais. Na reidratação, a maioria dos clones não apresentaram diferença em relação ao controle, que após 15 dias, variaram entre 0,05 a 0,08 mmol de glicose equivalente/g MS; com exceção do clone VM01, que reduziu o conteúdo de amido em 31% (Figura 4).

Similarmente ao observado para os açúcares solúveis, o teor de carboidratos não-estruturais (CNE) foi estável em todos os clones durante as diferentes épocas de coleta na condição controle, sendo maior no clone VM01 (70 mg/g MS) em relação aos outros genótipos (42 mg/g MS), que não diferiram entre si. Além disso, o teor de CNE no clone VM01 não variou em resposta aos tratamentos de déficit hídrico e reidratação, ao passo que os clones CO1275, I144 e CNB16 apresentaram aumento médio de 37% sob seca moderada. Sob seca severa, o clone CO1275 apresentou valor igual ao controle, sendo que os clones I144 e CNB16 responderam com aumentos de 33 e 10%, respectivamente. A resposta dos clones se manteve na reidratação, com o clone CO1275 não apresentando diferença em relação ao controle, e os clones I144 e CNB16 tendo aumentos de 35 e 49%, respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Variáveis metabólicas relacionadas aos teores de açúcares e carboidratos em clones de eucalipto, VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). Glicose, frutose, sacarose, amido e CNE (teor de carboidratos não-estruturais) nas condições de seca moderada, seca severa e reidratação. Dados estatísticos conforme Figura 2

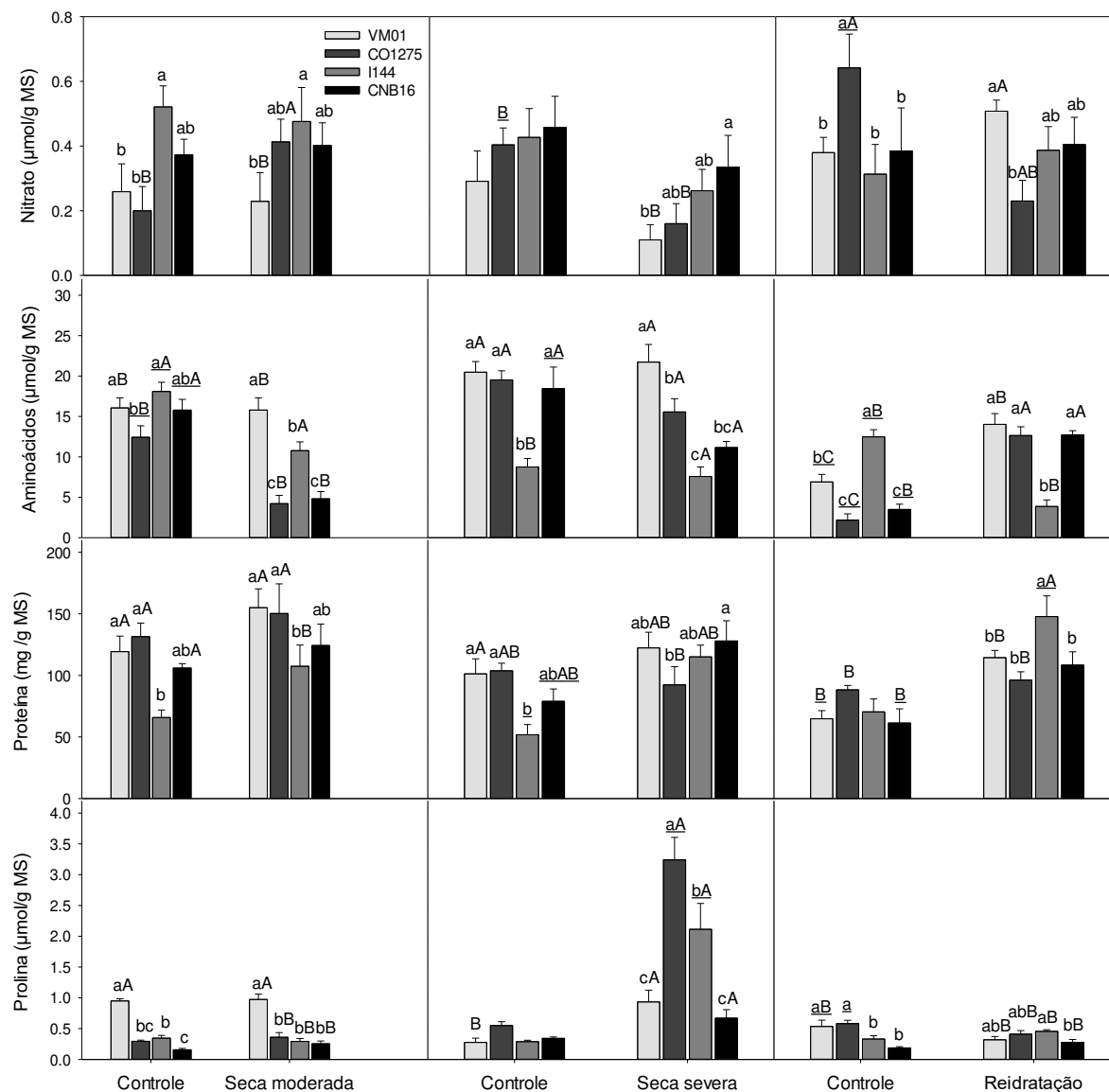


Diferentemente de outros metabólitos, a concentração de aminoácidos apresentou variação notável durante as épocas na condição controle. De modo geral, todos os clones apresentaram menores valores ao final do experimento em relação àqueles observados no começo, com destaque para os clones VM01, CO1275 e CNB16 em que estes valores foram menores que 6 $\mu\text{mol/g MS}$ no final e variaram

entre 12 e 17 $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ no início; valores intermediários foram observados pelo clone I144. Em contraste, tal decréscimo não foi observado nos materiais sobre déficit hídrico, que, inclusive, apresentaram aumento sob seca severa em relação à seca moderada. Na reidratação, os clones CO1275 e CNB16 mantiveram os valores observados na seca severa enquanto decréscimos ocorreram nos clones VM01 e I144. Essas alterações culminaram com os clones VM01, CO1275 e CNB16 apresentando, em relação aos controles, um aumento expressivo no conteúdo de aminoácidos, de 103, 480 e 260%, respectivamente; enquanto o clone I144 mostrou uma redução de 70%. Similarmente aos aminoácidos, a concentração de proteína sofreu redução ao longo do experimento, no entanto, esta redução foi mais marcada nos controles do que nas plantas sob déficit hídrico. Nos controles, os clones VM01, CO1275 e CNB16 apresentaram menor concentração de proteínas ao final do experimento (na reidratação), ao passo que o clone I144 manteve valores constantes. As plantas submetidas aos três regimes hídricos, quando comparados os valores de seca moderada em relação aos dados da reidratação, a concentração de proteínas foi menor nos clones VM01 e CO1275, igual no CNB16 e maior no I144. Quando comparados aos controles, na reidratação, os clones VM01, I144 e CNB16 apresentaram maior concentração de proteínas e o CO1275 apresentou valor igual ao seu controle.

O teor de prolina não respondeu ao efeito do déficit hídrico sob seca moderada; porém, nessa condição, destaca-se o clone VM01, que apresentou o maior valor médio (0,96 $\mu\text{mol/g MS}$) em comparação os demais clones (< 0,3 $\mu\text{mol/g MS}$). A seca severa proporcionou notável variação nos clones CO1275 e I144, com aumentos de 488 e 630%, respectivamente, em relação aos controles. Nessa mesma época, os controles não mostraram alteração genotípica, com variação de 0,27 a 0,55 $\mu\text{mol/g MS}$. Na reidratação, destaca-se que os massivos aumentos observados nos clones CO1275 e I144 sob seca severa retornaram à valores idênticos ou ainda menores que aqueles observados nos controles e também houve redução no teor de prolina no clones VM01 (40%). Os conteúdos de nitrato variaram de forma inconsistente ao longo do experimento, independente de genótipo ou regime hídrico (Figura 5).

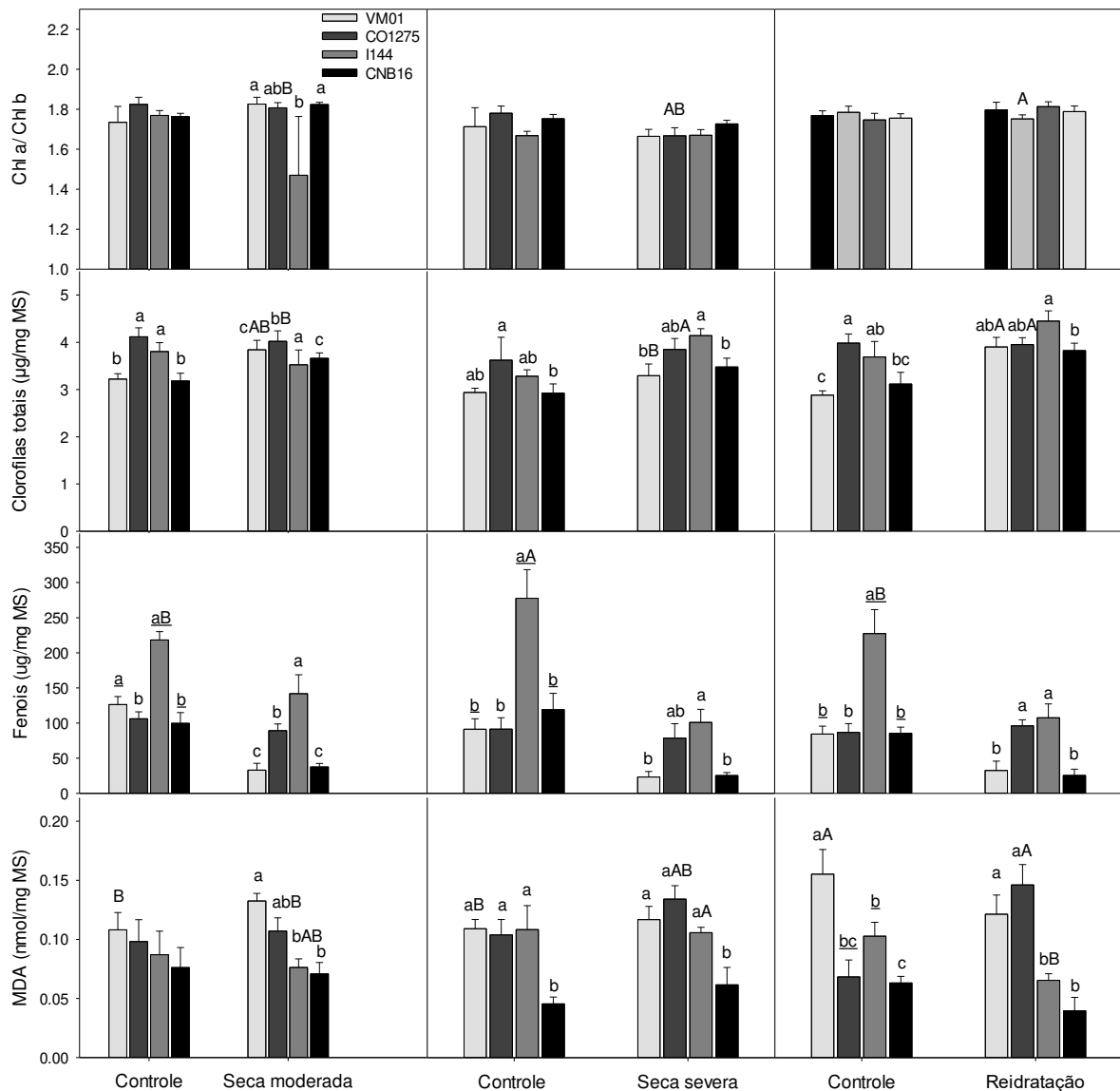
Figura 5. Variáveis metabólicas em clones de eucalipto, VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). Nitrato; Aminoácidos; Proteínas e Prolina nas condições de seca moderada, seca severa e reidratação. Dados estatísticos conforme Figura 2



Os clones não apresentaram diferença genotípica na razão clorofila a/clorofila b, em que os valores sempre ficaram próximos a 1,6, não sendo alterados pelos regimes hídricos. A concentração de clorofilas totais não se alterou em resposta aos diferentes regimes hídricos, somente sendo observadas diferenças genotípicas ao longo das épocas em que os valores variaram de 2,9 a 3,9 µg/mg MS. O padrão mais recorrente foi que os clones CNB16 e I144 apresentaram os maiores, enquanto os clones VM01 e CO1215, os menores valores de clorofilas totais.

O teor de fenóis apresentou redução para a maioria dos clones quando expostos ao déficit hídrico. Apenas o clone CO1275 não apresentou alterações nos teores de compostos fenólicos durante o experimento, mantendo valores médios de aproximadamente 92 µg/mg MS. Destaca-se o clone I144 para esta variável, apresentando os maiores valores em todas as épocas, tanto nos controles ($241,2 \pm 18,4$ µg/mg MS), quanto nos diferentes regimes hídricos ($116,8 \pm 12,7$ µg/mg MS). Sob seca moderada, houve redução nos clones VM01 (74%), I144 (108%) e CNB16 (62%), sendo que estas reduções no teor fenólico permaneceram sob seca severa e também durante a reidratação. Em relação ao teor de MDA, as plantas sob seca moderada ou severa não diferiram dos seus controles. Diante dessa resposta frente às duas condições de seca, conclui-se que as membranas celulares não foram danificadas no decorrer do experimento. Após a reidratação, o clone CO1275 apresentou um aumento de 115%, ao passo que o clone I144 reduziu em 37% o conteúdo de MDA, os demais clones foram iguais aos seus respectivos controles (Figura 6).

Figura 6. Variáveis metabólicas em clones de eucalipto, VM01 (tolerante), CO1215 (tolerante), I144 (intermediário) e CNB16 (sensível). Ch a/Ch b, razão de clorofila a/clorofila b; Chl totais, clorofilas totais; fenóis e MDA, aldeído malônico nas condições de seca moderada, seca severa e reidratação. Dados estatísticos conforme Figura 2



5. DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado buscou investigar, combinando análises de crescimento, relações hídricas, trocas gasosas e metabólicas, se existe um denominador comum na determinação da tolerância à seca em clones de eucalipto. Um diferencial do trabalho é que os genótipos utilizados foram selecionados em condições de campo, após episódios de seca severa, sendo considerados “clones elites” pelas empresas doadoras. Como os materiais genéticos possuem alto potencial para programas de melhoramento genético, é imperativo a busca por bioindicadores para facilitar o processo de seleção precoce de novas progênies.

A seca moderada não promoveu efeitos sobre o crescimento dos clones estudados

5.1 Dentre as várias classes de bioindicadores, análises de crescimento estão entre as mais utilizadas devido a sua simplicidade, baixo custo e por refletirem a fotossíntese e também o produto final; no entanto, em plantas juvenis, sua eficácia é dependente da manifestação da tolerância ainda neste estágio (Thomas e Winner, 2002). Apesar de Corrêa et al. (2017) terem encontrado correlação positiva entre os rankings de tolerância à seca em plantas adultas e juvenis de eucalipto utilizando parâmetros de crescimento, as avaliações de altura e diâmetro do caule não permitiram discriminação da tolerância neste estudo (Tabela 1). Isso reflete a importância do componente ontogenético nas variáveis fisiológicas, que, em *Quercus rubra*, foi responsável por até 50% da variação na capacidade fotossintética (Cavender-Bares e Bazzaz, 2000). Além disso, também em *Quercus*, diferenças interspecíficas na resposta à seca observadas em plantas adultas estavam ausentes na fase juvenil (Mediavilla e Escudero, 2004). Essa foi exatamente a resposta aqui observada em que clones selecionados como contrastantes na tolerância à seca apresentaram comportamento, em termos de crescimento vegetativo, idêntico sob seca moderada. Aparentemente, plantas juvenis priorizam o crescimento rápido para garantir seu estabelecimento, ao passo que plantas adultas, já estabelecidas, adotam estratégias mais conservadoras no uso de recursos. Interessantemente, a correlação entre crescimento potencial e susceptibilidade à seca encontrada em plantas juvenis de *E. globulus* e *E. calmadulensis* por Maseda e Fernández (2016) não foi verificada, mas ressalta-se que a base genética (*E. urophylla*, *E. calmadulensis* e *E. grandis*),

5.2 dos materiais aqui avaliados também é diferente, tão como as condições ambientais dos estudos.

Plantas juvenis não ajustaram seus parâmetros de relações hídricas sob seca moderada

As avaliações dos parâmetros de relações hídricas são fundamentais na compreensão de vários processos fisiológicos das plantas, destacando-se a capacidade de aquisição de água e expansão celular, essa última dependente da manutenção de pressão de turgor. O ajuste osmótico é comumente relatado nas plantas que enfrentam períodos de estresse, seja por seca ou baixas temperaturas,

em que o potencial osmótico diminui por meio de acúmulo ativo de solutos compatíveis no vacúolo ou citoplasma da célula (Ngugi et al., 2003; Callister et al., 2008). Em espécies herbáceas, o ajustamento osmótico tem sido considerado um importante bioindicador para seleção de genótipos mais tolerantes à seca (Blum, 2005). Por outro lado, em espécies lenhosas, o potencial osmótico tem sido considerado o principal determinante do ponto de perda de turgor (Bartlett et al., 2012) e contribuiu para a tolerância a seca em espécies da floresta Amazônica (Maréchaux et al., 2015).

Em eucalipto, o ajustamento osmótico em resposta à seca foi comum em várias espécies contrastantes quanto à aridez do seu ambiente de origem (Merchant et al., 2007) e também teve papel na tolerância ao frio (Callister et al., 2008). Apesar dos relatos de ajustamento osmótico em eucalipto, este não foi observado nas condições do nosso estudo e também não houve grande variabilidade (9,1 – 11,5 MPa) no potencial osmótico em turgescência plena (Tabela 2). Não obstante, a razão para tal discrepância com os dados de Merchant et al. (2007) parece ser justamente a intensidade do déficit hídrico aplicado, uma vez que sob seca moderada (o nível aqui utilizado, 60% CC) as plantas apresentaram potencial hídrico semelhante aos controles, provavelmente em função da reduzida condutância estomática (Figura 2). Outra possível explicação é a aclimação dos clones a seca moderada, visto que as plantas estiveram sob seca moderada por três meses. Resultados semelhantes foram encontrados por Warren et al. (2007) com *E. marginata* e, em estudo conduzido com 13 espécies de eucalipto, aquelas que mantiveram elevado conteúdo relativo de água sob déficit hídrico também não apresentaram aumento na osmolaridade do suco celular (Merchant et al., 2006).

O ajustamento elástico também não foi observado nos nossos genótipos, porém, sua contribuição para a tolerância à seca foi questionada em meta-análise por Bartlett et al. (2012). Em adição, fator complicante referente ao módulo de elasticidade é a sua variação com a idade da folha (Merchant et al., 2007), tornando difícil a comparação entre estudos. De todo modo, é interessante que o padrão de mudanças nos parâmetros de relações hídricas, ainda que não significativo, foi idêntico em todos os genótipos sob seca: o potencial osmótico ficou mais negativo, o módulo de elasticidade diminuiu e o ponto de perda de turgor ficou mais negativo. Essa observação reforça a similaridade de estratégias entre os genótipos e, aparentemente,

a tolerância diferencial não é baseada em alterações nos parâmetros de relações hídrica em plantas juvenis. Ressalta-se que Callister et al. (2008) também concluíram, após avaliarem três espécies puras e 29 híbridos de eucalipto, que a seleção para tolerância à seca deve ser baseada em clones que apresentam melhor desempenho em condições de campo sob déficit hídrico, não sendo o potencial osmótico um critério de seleção confiável.

O clone CO1275 apresenta melhor desempenho fotossintético sob seca moderada

5.3

Primeiramente, procurou-se identificar se os genótipos difeririam quanto ao seu potencial fotossintético por meio dos parâmetros V_{cmax}/J_{max} e se estes parâmetros apresentavam plasticidade em resposta ao déficit hídrico. Foram encontradas evidências de que os clones I144 e CO1275 possuem menor e maior investimento em maquinaria fotossintética, respectivamente. No entanto, apesar das medidas de trocas gasosas indicarem que este menor potencial fotossintético não penaliza o clone I144, elas apontam melhor desempenho fotossintético do clone CO1275 (Figura 2).

Interessantemente, o clone CO1275 é um genótipo puro de *E. calmadulensis*, apresentando anfiestomatia e possui a maior densidade estomática dentre os genótipos avaliados (Martins e Araújo, informação pessoal). Em resposta ao déficit hídrico moderado, houve clara tendência de maior investimento na maquinaria fotossintética, o que pode, inclusive, explicar parcialmente os maiores valores de fotossíntese líquida após reidratação. Esses resultados vão ao encontro dos observados por Turnbull et al. (2007) com *E. globulus* em que as taxas fotossintéticas responderam positivamente à desfolha, a qual também ocorreu sob seca severa neste estudo. Os autores atribuíram esse aumento aos maiores valores de V_{cmax} e J_{max} na folhagem remanescente dado que a condutância estomática foi semelhante entre os tratamentos controle e com desfolha. Aparentemente, plantas de eucalipto possuem elevado crescimento compensatório, sendo capazes de suportar reduções de até 60% na área foliar sem alterar os incrementos em diâmetro e altura (Quentin et al., 2012). Acredita-se que as plantas utilizem de mecanismos fisiológicos de compensação envolvendo respostas de curto e longo-prazos tais como reduzida alocação de carbono para raízes grossas, mobilização de reservas de carboidratos, alta

plasticidade no metabolismo interno do nitrogênio e mudanças na alocação de biomassa entre folhas e ramos (Eyles et al., 2009).

Tanto a construção das curvas A/C_i quanto as medidas pontuais de trocas gasosas não permitiram discriminação de genótipos quanto à susceptibilidade à seca. A seca moderada foi efetiva em reduzir a condutância estomática, contribuindo para manutenção do status hídrico, no entanto, isto ocorreu com redução das taxas fotossintéticas e crescimento das plantas. Averiguou-se sobre até que ponto a capacidade de recuperação das taxas fotossintéticas após período de déficit poderia diferir entre os genótipos, uma vez que Zhou et al. (2015) demonstraram diferenças nesta habilidade em *E. camaldulensis* e *E. occidentalis*. Novamente, não foram observadas diferença entre os genótipos na recuperação de trocas gasosas, apesar desta ter ocorrido em tempo maior (15 dias) do que observado em alguns estudos. Por exemplo, plantas de *E. globulus* recuperaram as taxas fotossintéticas após um dia de reidratação e a condutância estomática após uma semana (Correia et al., 2014). *E. argophloia* e *E. cloeziana* reverteram as trocas gasosas após quatro dias do estabelecimento das condições de controle (Correia et al., 2018). O maior período de recuperação foi relatado no estudo de Warren et al. (2011), em que a fotossíntese líquida foi similar aos controles aos 5 ou 11 dias após a reidratação das espécies de eucalipto estudadas.

Uma possível explicação para a discrepância nos tempos de recuperação passa justamente pelo nível de dano no sistema vascular que as plantas foram sujeitas. Aqui, todas as plantas atingiram pelo menos -4 MPa, e dados de vulnerabilidade hidráulica obtidos por Martins e Araújo (informação pessoal) nestes mesmos genótipos indicam que todos os clones foram sujeitos à falha hidráulica nas folhas, potencialmente explicando o retardo na recuperação de trocas gasosas. Skelton et al. (2017) encontraram em diversas espécies lenhosas que a recuperação das trocas-gasosas após eventos de seca natural é rápida a menos que eventos de falha hidráulica tenham ocorrido, o que vai totalmente ao encontro dos nossos resultados.

Padrão das alterações metabólicas e composição bioquímica dos clones estudados

5.4 A mensuração da composição bioquímica e de metabólitos primários, apesar de não ter permitido discriminar genótipos tolerantes e sensíveis à seca, permitiu visualizar notável plasticidade metabólica em resposta ao déficit hídrico. Primeiramente, a seca moderada promoveu aumento nos teores de sacarose, possivelmente pela redução das taxas de crescimento e manutenção parcial das trocas gasosas, no entanto, esse excesso de fotoassimilados não foi elevado, a julgar pela manutenção dos teores de amido. Já em seca severa, foi notável a conversão de amido em sacarose, muito provavelmente para manter a osmolaridade da célula.

Callister et al. (2008), analisando os diferentes contribuintes do potencial osmótico, concluíram que os açúcares solúveis representam a maior parte da osmolaridade celular e os aminoácidos, a menor parte. Estes resultados corroboraram os obtidos por Warren et al. (2007) que descartaram aumentos em prolina como importantes para o ajustamento osmótico, sendo, provavelmente, mais relevantes como um “*scavenger*” de espécies reativas de oxigênio, atuando no sistema antioxidante (Hayat et al., 2012). Em concordância com essa função antioxidante, houve justamente o aumento de prolina sob seca severa, em que a pressão oxidativa é maior em função do processo fotossintético, pelo maior dreno de elétrons, sofrer forte inibição em decorrência da redução da condutância estomática. De todo modo, a plasticidade nos teores de prolina foi notável: houve aumentos substanciais em dois clones sob seca severa e nenhuma mudança nos outros. Isso demonstra a não-essencialidade das mudanças em prolina, sendo estratégia particular adotada por alguns genótipos. Não obstante, ressalta-se que todos os genótipos tiveram performance similar no sistema antioxidante a julgar pela ausência de peroxidação lipídica e fotoinibição, mesmo sob seca severa. Apesar da ausência de danos oxidativos, o longo tempo de recuperação pós-estresse pode ser devido aos danos hidráulicos ou elevada síntese de ácido abscísico (Martorell et al., 2014).

Ao longo do experimento, o *pool* total de carboidratos não-estruturais sofreu pouca alteração, o que pode ser atribuído ao impedimento do transporte do floema sob seca severa (Blackman et al., 2019), principalmente levando-se em conta que as

folhas sofreram falha hidráulica. Alternativamente, é possível que a respiração em nível de planta inteira tenha reduzido bastante sob seca severa, não levando ao consumo líquido de carboidratos, ocorrendo apenas a interconversão de amido em sacarose para fins osmóticos. Quando o déficit hídrico acontece de forma mais moderada e com maior duração, é observado com frequência o esgotamento dos teores de amido, como visto por Mitchell et al. (2014) em *E. globulus*. Em relação ao metabolismo de proteínas e aminoácidos, foi curioso a redução do conteúdo destes compostos na condição controle, ao passo que houve manutenção sob seca. Valdés et al. (2013) avaliaram o proteoma de *E. globulus* e encontraram acúmulo de várias proteínas relacionadas à tolerância contra estresses abióticos na condição de déficit hídrico.

Os genótipos também apresentaram diferença quanto ao acúmulo e degradação de compostos fenólicos totais sob seca. Com exceção do clone CO1275, o qual manteve teor de fenóis inalterado independentemente dos tratamentos, todos os outros genótipos tiveram decréscimos nos fenóis sob seca moderada, e, curiosamente, a seca severa não provocou decréscimos adicionais. Portanto, a redução no acúmulo dos fenóis foi resposta à redução na disponibilidade de fotoassimilados, indicando detrimento no investimento em metabólitos secundários sob estresse. Essa observação é importante porque acredita-se que a composição fenólica possa impactar a capacidade de defesa das plantas, assim, plantas já debilitadas pela seca seriam ainda mais susceptíveis ao ataque de agentes bióticos (Niinemets, 2015). O mais notável é a manutenção de nível similar de compostos fenólicos sob déficit, porém, por meio de estratégias diferentes: o clone CO1275 manteve teores estáveis, ao passo que o clone I144 investiu inicialmente em maior teor, mantendo níveis maiores que os clones VM01 e CNB16 mesmo após o déficit. Entretanto, é importante destacar não somente a quantidade, mas também a qualidade dos compostos fenólicos presentes, a qual sabe-se que apresenta diferenças genotípicas e também responde diferencialmente em resposta ao déficit hídrico (McKiernan et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

Os clones estudados apresentam tolerância semelhante à seca moderada e severa, na qual o comportamento dos clones na fase juvenil não acompanhou o ranking de tolerância pré-estabelecido em campo nas plantas adultas. Nas condições avaliadas, a relação distante entre os clones tolerantes e sensível no ranking de tolerância foi perdida. Assim, resta demonstrar em árvores adultas se os mecanismos aqui avaliados seriam importantes na tolerância diferencial à seca. De modo que, a compreensão de outros mecanismos, como os ajustes hidráulicos, por exemplo, seja explorada em conjunto. Caso os resultados sejam validados no campo, eles apontam para a necessidade de se aprofundar os estudos envolvendo o papel da prolina sob seca e também como mudanças na composição de metabólitos secundários afetariam o desenvolvimento e capacidade de defesa da planta. Isso é especialmente importante porque a reduzida capacidade de defesa, em conjunto com outros estresses abióticos, pode aumentar a susceptibilidade das plantas ao ataque de pragas e doenças, comprometendo o sucesso de futuros plantios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams HD, Zeppel MJB, Anderegg WRL, Hartmann H, Landhausser SM, Tissue DT, Huxman TE, Hudson PJ, Franz TE, Allen CD, et al. (2017) A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality Henry. *Nature Ecology & Evolution* **1**: 1285

APHA, AWWA, WPCF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association 21st ed., Washington D.C

Asada, K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601-639

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

Bieleski RI, Turner NA (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plants extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Analytical Biochemistry* **17**: 278-293

Bilger W, Schreiber U (1986) Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth Research* **10**: 303-308

Blackman CJ, Creek D, Maier C, Aspinwall MJ, Drake JE, Pfautsch S, ... Choat B (2019) Drought response strategies and hydraulic traits contribute to mechanistic understanding of plant dry-down to hydraulic failure. *Tree physiology* **39**: 910-924

Blum A (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive?. *Australian Journal of Agricultural Research* **56**: 1159-1168

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**: 248-254

Callister AN, Arndt SK, Ades PK, Merchant A, Rowell D, Adams MA (2008) Leaf osmotic potential of Eucalyptus hybrids responds differently to freezing and drought, with little clonal variation. *Tree Physiology* **28**: 1297-1304

Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in soil science and plant analysis* **6**: 71-80

Cavender-Bares J, Bazzaz FA (2000) Changes in drought response strategies with ontogeny in *Quercus rubra*: implications for scaling from seedlings to mature trees. *Oecologia* **124**: 8-18

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

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, Pintó-Marijuan M, Neves L, Brossa R, Dias MC, Costa A, ... Pinto G (2014) Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum* **150**: 580-592

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

Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B, Sud UF (1995) Limitation of net CO₂ assimilation rate by internal resistances to CO₂ transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill). *Plant Cell and Environment* **18**: 43–51

Eyles A, Pinkard EA, Mohammed C (2009) Shifts in biomass and resource allocation patterns following defoliation in *Eucalyptus globulus* growing with varying water and nutrient supplies. *Tree Physiology* **29**: 753-764

Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78–90

Fensham RJ, Fairfax RJ (2007) Drought-related tree death of savanna eucalypts: species susceptibility, soil conditions and root architecture. *Journal of Vegetation Science* **18**: 71–80

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

Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell Environ* **30**: 1284–1298

Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **990**: 87–92

Harley PC, Sharkey TD (1991) An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research* **27**: 169–178

Hayat S, Hayat Q, Alyemini MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behavior* **7**: 1456–1466

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198

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

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**: 604–611

Indústria Brasileira de Árvores (2017) Antunes K, Rocha E, Salim A, Panizzi F, Teles R, Koch Z, Rezende G. Disponível em: https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf

Lewis JD, Phillips NG, Logan BA, Hricko C R, Tissue DT (2011) Leaf photosynthesis, respiration and stomatal conductance in six Eucalyptus species native to mesic and xeric environments growing in a common garden. *Tree Physiology* **31**: 997–1006

Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2393–2401

Maréchaux I, Bartlett MK, Sack L, Baraloto C, Engel J, Joetzjer E, Chave J (2015) Drought tolerance as predicted by leaf water potential at turgor loss point varies strongly across species within an Amazonian forest. *Functional Ecology* **29**: 1268-1277

Martins SCV, Detmann KC, REIS JV dos, Pereira LF, Maria L, Pereira V, DaMatta FM (2013) Photosynthetic induction and activity of enzymes related to carbon metabolism : insights into the varying net photosynthesis rates of coffee sun and shade leaves. *Theor Exp Plant Physiol* **25**: 62–69

Martorell Llitas S, Diaz-Espejo A, Medrano H, Ball M, Choat B (2014) Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: Linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant, Cell & Environment* **37**: 617-626

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

McCulloh KA, Sperry JS (2005) Patterns in hydraulic architecture and their implications for transport efficiency. *Tree Physiology* **25**: 257-267

McDowell N, Pockman WT, Allen C D, Breshears DD, Cobb N, Kolb T., ... Yezzer EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New phytologist* **178**: 719-739

McKiernan AB, Potts BM, Hovenden MJ, Brodribb TJ, Davies NW, Rodemann T, ... O'Reilly-Wapstra JM (2015). A water availability gradient reveals the deficit level required to affect traits in potted juvenile *Eucalyptus globulus*. *Annals of Botany* **119**: 1043-1052

Mediavilla S, Escudero A (2004) Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *Forest Ecology and Management* **187**: 281-294

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

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 & Environment* **29**: 2017-2029

Mitchell PJ, O'Grady AP, Tissue DT, et al (2013) Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist* **197**: 862-872

Mitchell PJ, O'Grady AP, Tissue DT, Worledge D, Pinkard EA (2014) Co-ordination of growth, gas exchange and hydraulics define the carbon safety margin in tree species with contrasting drought strategies. *Tree Physiology* **34**: 443-458

Ngugi MR, Doley D, Hunt MA, Dart P, Ryan P (2003) Leaf water relations of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus argophloia* in response to water deficit. *Tree physiology* **23**: 335-343

Niinemets Ü (2015) Uncovering the hidden facets of drought stress: secondary metabolites make the difference. *Tree Physiology* **36**: 129-132

Quentin AG, O'Grady AP, Beadle CL, Mohammed C, Pinkard EA (2012) Interactive effects of water supply and defoliation on photosynthesis, plant water status and growth of *Eucalyptus globulus* Labill. *Tree Physiology* **32**: 958-967

Saadaoui E, Yahia KB, Dhahri S, Jamaa MLB, Khouja ML (2017) An overview of adaptative responses to drought stress in *Eucalyptus* spp. *Forestry Studies* **67**: 86-96

Sack L, Scoffoni C (2012) Measurement of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance and their responses to irradiance and dehydration using the evaporative flux method (EFM). *Plant Physiology* **156**: 1–7

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

Shahidi F, Naczki M (1995) Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing Company Incorporated **1**: 331

Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* **51**: 53–105

Skelton RP, Brodribb TJ, McAdam SA, Mitchell PJ (2017) Gas exchange recovery following natural drought is rapid unless limited by loss of leaf hydraulic conductance: evidence from an evergreen woodland. *New Phytologist* **215**: 1399-1412

Thomas SC, Winner WE (2002) Photosynthetic differences between saplings and adult trees: an integration of field results by meta-analysis. *Tree physiology* **22**: 117-127

Turnbull TL, Adams MA, Warren CR (2007) Increased photosynthesis following partial defoliation of field-grown *Eucalyptus globulus* seedlings is not caused by increased leaf nitrogen. *Tree Physiology* **27**: 1481-1492

Valdés AE, Irar S, Majada JP, Rodríguez A, Fernández B, Pagès M (2013) Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. *Journal of proteomics* **79**: 263-276

Warren CR, Aranda I, Cano FJ (2011) Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. *Plant, Cell & Environment* **34**: 1609-1629

Warren CR, Bleby T, Adams MA (2007) Changes in gas exchange versus leaf solutes as a means to cope with summer drought in *Eucalyptus marginata*. *Oecologia* **154**: 1

Whitehead D, Beadle CL (2004) Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: a review. *Forest Ecology and Management* **193**: 113-140

Yemm DG, Cocking E C (1955) Estimation of amino acids by ninhydrin. *The Analyst* **80**: 203-213

Zhou SX, Medlyn BE, Prentice IC (2015) Long-term water stress leads to acclimation of drought sensitivity of photosynthetic capacity in xeric but not riparian *Eucalyptus* species. *Annals of Botany* **117**: 133-144