

DENISSON LIMA DO NASCIMENTO

**BIOMARCADORES QUÍMICOS DE RÁPIDA DETECÇÃO DE CLONES
TOLERANTES AO DISTÚRBO FISIOLÓGICO DO EUCALIPTO**

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

Orientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli

Coorientadores: Sergio Antônio Fernandes
Éva Domokos-Szabolcsy

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

N244b
2024

Nascimento, Denisson Lima do, 1996-
Biomarcadores químicos de rápida detecção de clones
tolerantes ao distúrbio fisiológico do eucalipto / Denisson Lima
do Nascimento. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (90 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitotecnia, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.092>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalyptus. 2. Seleção de plantas - Melhoramento
genético. 3. Estresse (Fisiologia). 4. Biomarcadores. I. Picoli,
Edgard Augusto de Toledo, 1974-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552


DENISSON LIMA DO NASCIMENTO

**BIOMARCADORES QUÍMICOS DE RÁPIDA DETECÇÃO DE CLONES
TOLERANTES AO DISTÚRBO FISIOLÓGICO DO EUCALIPTO**


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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 DENISSON LIMA DO NASCIMENTO
Data: 05/03/2024 10:40:02-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Denisson Lima do Nascimento
Autor

Documento assinado digitalmente
 EDGARD AUGUSTO DE TOLEDO PICOLI
Data: 04/03/2024 11:52:22-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Edgard Augusto de Toledo Picoli
Orientador

*A Deus, aos meus pais,
Maria Jaciara Lima do Nascimento
e Donizete Afonso do Nascimento.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado e esse trabalho.

Ao Departamento de Agronomia, pela disponibilidade de estrutura, equipamentos e reagentes para realização da pesquisa.

Aos meus pais, Donizete Afonso do Nascimento e Maria Jaciara Lima do Nascimento, pelo incentivo, cuidado e dedicação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edgard Augusto de Toledo Picoli, pela orientação, atenção, dedicação e valiosos ensinamentos que me ajudaram durante a realização desta pesquisa e em minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Suzano S.A. pelo financiamento e por ceder o material vegetal para a realização deste projeto de pesquisa.

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

E muito obrigado a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

NASCIMENTO, Denisson Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Biomarcadores químicos de rápida detecção de clones tolerantes ao distúrbio fisiológico do eucalipto.** Orientador: Edgard Augusto de Toledo Picoli. Coorientadores: Sergio Antônio Fernandes e Éva Domokos-Szabolcsy.

O eucalipto é responsável pela maior parte da produção de florestas plantadas no território brasileiro sendo o sucesso dos plantios associado à adaptabilidade dos clones ao ambiente. O estresse abiótico é capaz de provocar alterações que levam a uma anomalia conhecida como distúrbio fisiológico do eucalipto (DFE). O DFE inclui sintomas como a perda da dominância apical, trincamento de casca e emissão de brotações adventícias ao longo do tronco, podendo levar a morte de genótipos suscetíveis. O uso de biomarcadores mensuráveis pode contribuir como critério de seleção de clones tolerantes, motivo pelo qual o objetivo desse trabalho foi analisar biomarcadores químicos no intuito de se obter informações mais rápidas para diferenciação de clones tolerantes ao distúrbio fisiológico. Um experimento em campo foi realizado em delineamento de blocos casualizados, no qual foram avaliados 30 clones, dos quais 9 foram selecionados com base no fenótipo divergente para as notas de DFE. Três árvores por clone foram amostradas ao longo do fuste nas posições do DAP (diâmetro à altura do peito), 50% e 75% da altura total. A casca e lenho foram separados e amostra composta preparadas com material vegetal das três alturas avaliadas. A composição de compostos fenólicos (ácido cafeico, quercetina e ácido gálico), a relação sirigil/guaiacil (S/G), a concentração de carboidratos (redutores e não-redutores), aminoácidos, amido, solução da amostra de pH e condutividade elétrica foram avaliadas. As árvores derrubadas para o estudo tiveram uma nota atribuída referente a intensidade do distúrbio que serviu de referencial para as análises junto com os dados históricos da ocorrência do DFE nas áreas de plantio comercial. A pirólise de amostras de eucalipto é uma técnica rápida e barata, com potencial para gerar dados a contribuir para a compreensão do distúrbio fisiológico do eucalipto, apesar de sua repetibilidade ser insatisfatória. A exceção foi a relação S/G que apresentou diferenças entre os clones testados. A concentração total de aminoácidos, fenólicos e açúcares não pode ser associada diretamente aos clones tolerantes ao distúrbio, ainda que existam correlações significativas com algumas destas variáveis. O pH da solução de amostras de casca e lenho e concentração de compostos específicos, como ácido cafeico, quercetina e ácido gálico, contribuíram para a discriminação dos clones. Existem correlações positivas e significativas entre variáveis químicas

condutividade elétrica, aminoácidos e pH da casca e pH do lenho com as notas do histórico de DFE e das árvores avaliadas.

Palavras-chave: Melhoramento de plantas. Eucalyptus. Resposta ao estresse.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Denisson Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Rapid detection chemical biomarkers for clones tolerant to Eucalyptus Physiological Disorder.** Advisor: Edgard Augusto de Toledo Picoli. Co-Advisor: Sergio Antônio Fernandes and Éva Domokos-Szabolcsy.

Eucalyptus is responsible for most of the production of planted forests in Brazilian territory, with the success of the plantations being associated with the adaptability of the clones to the environment. Abiotic stress is capable of causing changes that lead to an anomaly known as eucalyptus physiological disorder (EFD). EFD includes symptoms such as loss of apical dominance, bark cracking and emission of adventitious shoots along the trunk, which can lead to the death of susceptible genotypes. The use of measurable wood biomarkers can contribute as a selection criterion for tolerant clones, which is why the objective of this work was to analyze chemical biomarkers in order to obtain faster information for differentiating clones tolerant to the physiological disorder. A field experiment was carried out in a randomized block design, in which 30 clones were evaluated and, of these, 9 were selected based on the divergent phenotype for EFD scores. Three trees per clone were sampled along the stem at the positions of DBH (diameter at breast height), 50% and 75% of the total height. The bark and wood were separated and composite samples prepared with plant material from the three heights evaluated. The composition of phenolic compounds (caffeic acid, quercetin and gallic acid), the sirigyl/guaiacyl ratio (S/G), the concentration of carbohydrates (reducing and non-reducing); amino acids and starch, pH, electrical conductivity were evaluated. The trees felled for the study had a score assigned relating to the intensity of the disturbance that served as a reference for the analyzes together with historical data on the occurrence of EFD in commercial planting areas. Pyrolysis of eucalyptus samples is a fast and cheap technique, with the potential to generate data that can be used to understand the physiological disorder of eucalyptus; however, its repeatability is unsatisfactory. The S/G ratio was an exception as it differed among the diverging clones. The total concentration of amino acids, phenolics and sugars could not be directly associated with clones tolerant to the disorder, although there are significant correlations with some of these variables. The pH of the solution of bark and wood samples and the concentration of specific compounds, such as caffeic acid, quercetin and gallic acid, contributed to the discrimination of the clones. There are positive and significant correlations between chemical variables electrical conductivity, amino acids and bark and wood pH with the scores of DFE historical data and from the sampled trees.

Keywords: Plant breeding. Eucalyptus. Stress response.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	13

PIRÓLISE DE AMOSTRAS DA CASCA E LENHO DE CLONES DIVERGENTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO DISTÚRBO FISOLÓGICO DO EUCALIPTO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1 Local de condução.....	21
2.2 Coleta do material	22
2.3 Pirólise.....	23
2.4 Análise estatística	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS	35

ANÁLISES BROMATOLÓGICAS DA CASCA E LENHO DE CLONES DIVERGENTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO DISTÚRBO FISIOLÓGICO DO EUCALIPTO

1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 Local de condução.....	52
2.2 Coleta do material	52
2.3 Análise bromatológica.....	53
2.4 Análise de HPLC.....	58
2.5 Análise estatística	59
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	60
4. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE	86

INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal apresenta produtos como carvão, toras serradas e para combustível, madeira para papel e celulose, além de constituir matéria prima para a indústria química. A movimentação de matéria prima e recursos financeiros do setor é expressiva onde, em 2022, chegam à exportação de 1,72 bilhões de metros cúbicos de madeira (não-conífera) para combustível e a produção de 78,6 toneladas de papel para impressão e escrita, equivalendo a 0,52 e 37,4 bilhões de dólares, respectivamente (FAO, 2023). Dentre as espécies florestais cultivadas, o eucalipto é responsável pela maior parte da produção florestal no mundo (ZHANG e WANG, 2021) fazendo com que o Brasil se destaque mundialmente em termos de produtividade (IBA, 2023).

As florestas plantadas apresentam elevado potencial de crescimento e estão distribuídas em todo o território brasileiro, onde se destacam os estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e São Paulo, cada um com contribuições equivalentes a mais de 1 milhão de hectares. O Brasil está entre os top 10 países na produção de painéis de madeira, carvão vegetal, madeira serrada e, em 2022, apresentou 9,94 milhões de hectares plantados, dos quais 76% são com eucalipto, que representa cerca de 25% do total global dessa espécie (ELLI et al., 2020; IBÁ, 2023).

O eucalipto engloba centenas de espécies (BROOKER, 2000) e é adaptado a regiões de clima árido a planícies onde a plasticidade dos genótipos e espécies contribuem para sua sobrevivência (BROOKER e KLEINGING, 2006; VALLADARES et al., 2007; BOOTH 2013; PICOLI et al., 2021). O sucesso dos plantios está ligado à adaptabilidade do genótipo às condições edafoclimáticas do local do cultivo, sendo a precipitação, a temperatura e a nutrição, alguns dos fatores que influenciam o crescimento do eucalipto (JARDIM et al., 2018).

A expansão das áreas de plantio, as mudanças climáticas, o manejo intensivo, a redução do ciclo e busca constante por materiais mais produtivos, implicam em desafios para a cultura do eucalipto. Dentre estes desafios, o distúrbio fisiológico do eucalipto (DFE) foi registrado em diferentes locais no mundo (DIANESE et al., 1984; FENSHAM e HOLMAN, 1999; JURSKIS, 2005; LEITE et al., 2014) em florestas naturais e plantios comerciais, inclusive no Brasil (DIANESE et al., 1984; LEITE et al., 2014; CORRÊA et al., 2017). Nas últimas duas décadas, diversas plantações de eucalipto no Brasil têm sido afetadas por estresses abióticos com impacto significativo no setor florestal (TESHOME et al., 2020). Em 2008, técnicos florestais da Suzano S.A. (antiga Fibria Celulose S.A.) relataram pela primeira vez a ocorrência de sintomas e sinais desse distúrbio em regiões do norte do Estado do Espírito Santo e do extremo sul do Estado da

Bahia, Brasil (RODRIGUES, et al., 2022). Apesar de fatores abióticos, como o déficit hídrico, serem listados como um dos principais gatilhos para a ocorrência do DFE (FENSHAM e HOLMAN, 1999; JURSKIS, 2005; CORRÊA et al 2017; CAETANO-MADEIRA et al., 2023), a etiologia do distúrbio é complexa (MUELLER-DOMBOIS, 1986, WHITE et al., 1998; CUNNINGHAM et al., 1999; FONSECA et al., 2000; CARNICER et al., 2011).

Os sintomas associados ao DFE incluem trincamento da casca, perda de dominância apical, emissão de brotações adventícias ao longo do tronco, além de abscisão foliar e dentre outros (ALFENAS et al., 2009; ALMEIDA, et al., 2022). Além disto, existem relatos de efeitos negativos diretos na qualidade da madeira e na produção e polpa de celulose (CÂMARA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2022). Rodrigues et al. (2022) observaram que plantas em maior nível de estresse apresentaram mais extrativos e conteúdo de lignina, enquanto Caetano-Madeira et al. (2023) relataram diferenças significativas de metabólitos, nutrição mineral e desenvolvimento de clones divergentes quanto a tolerância ao DFE submetidos a tratamento de déficit hídrico.

A associação de metabólitos com a tolerância ao estresse hídrico e ao DFE (DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023; CAETANO-MADEIRA et al., 2023) e a ausência de estudos abordando a casca de eucalipto (PICOLI et al., 2021) consistiram, portanto, em um norte para este trabalho. O sucesso na discriminação de clones de eucalipto tolerantes ao déficit hídrico (DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023) e a relação do DFE com o déficit hídrico (FENSHAM e HOLMAN, 1999; JURSKIS, 2005; PICOLI et al., 2021) contribuíram para a idealização deste projeto de pesquisa visando a colaborar com a compreensão do distúrbio e dar suporte a uma demanda induzida da Suzano S.A.

Amostras de clones divergentes quanto a tolerância ao DFE e conduzidas em área comercial que apresenta condições favoráveis para a ocorrência do distúrbio fisiológico foram coletadas. As amostras foram processadas de forma simples de acordo com o procedimento para análise de composição mineral. Este processamento visou maior rapidez e menor custo da avaliação. Este trabalho foi desenvolvido para a avaliação de características químicas de amostras da casca e lenho de clones comerciais divergentes quanto a ocorrência do DFE e investigar a relação destes atributos com o fenótipo de tolerância. A versatilidade e rapidez na obtenção de dados para caracterização da lignina e outros fenólicos por meio das técnicas de pirólise (SILVA, 2006; MARCELO, 2007), a especificidade de detecção HPLC (SANTOS et al., 2017) e praticidade para a detecção de carboidratos em amostras lenhosas por colorimetria (CHOW e LANDHÄUSSER, 2004; RAZOUK et al., 2022) foram critérios para a escolha das técnicas a serem utilizadas.

Por fim, este trabalho foi dividido em dois capítulos na busca de informações aplicadas da casca e lenho para se gerar biomarcadores úteis para auxiliar o processo de seleção e contribuir para a compreensão do DFE.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C; ZAUZA, E. A. V; MAFIA, R. G; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2ª Edição, Editora UFV, Viçosa, MG, 500p, 2009.

ALMEIDA, M. N. F.; PICOLI, E. A. T.; MOULIN, J. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ZAUZA, E. A. V.; LOOS, R. A.; HALL, K. B.; GOMES, D. S.; CONCEIÇÃO, G. J.; RODRIGUES, P. D.; VIDAURRE, G. B. Propriedades da madeira como potenciais biomarcadores de tolerância a distúrbios fisiológicos: comparação de genótipos de eucalipto divergentes. **Scientia Forestalis**, v, 50, e3864, jul, 2022.

BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 28-34, ago. 2013.

BOUILLET, J. P.; LACLAU, J. P.; GONÇALVES, J. L. M.; MOREIRA, M. Z.; TRIVELIN, P. C. O.; JOURDAN, C.; SILVA, E. V.; PICCOLO, M. C.; TSAI, S. M.; GALIANA, A. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 12, p. 3918-3930, jun. 2008.

BROOKER M. I. H.; KLEINIG, D. A. **Field guide to eucalypts**. Volume 1. South Eastern Australia, Third Edition. Ed. Inkata Press Pty Ltd, 2006, 356p. 2006.

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 13, n. 1, p. 79, 2000.

CAETANO-MADEIRA, D. D.; OMENA-GARCIA, R. P.; ELERATI, T. L.; LOPES, C. B. S.; CORRÊA, T. R.; SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, L. A.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; NUNES-NESI, A. COSTA W. G. PICOLI, E. A. T. Metabolic, Nutritional and Morphophysiological Behavior of Eucalypt Genotypes Differing in Dieback Resistance in Field When Submitted to PEG-Induced Water Deficit. **Agronomy**, v. 13, n. 5, p. 1261, abr. 2023. doi:10.3390/agronomy13051261.

CÂMARA, A. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; BOBADILHA, G. S.; VIDAURRE, G. B.; TOMAZELLO FILHO, M.; SOLIMAN, E. P. Physiological disorders affecting dendrometric parameters and *Eucalyptus wood* quality for pulping wood. **CERNE**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2018.

CARNICER, J.; COLL, M.; NINYEROLA, M.; PONS, X.; SÁNCHEZ, G.; PEÑUELAS, J. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 4, p. 1474-1478, 10 jan. 2011.

CHOW, P. S.; LANDHÄUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, v. 24, n. 10, p. 1129-1136, 2004.

CORRÊA, T. R.; PICOLI, E. A. D. T.; SOUZA, G. A. D.; CONDÉ, S. A.; SILVA, N. M.; LOPES M., K. L. B.; RESENDE, M. D. V. D.; ZAUZA, E. A. V.; ODA, S. Phenotypic markers in early selection for tolerance to dieback in *Eucalyptus*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 130-138, 2017.

CUNNINGHAM, S. A.; SUMMERHAYES, B.; WESTOBY, M. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. **Ecological Monographs**, v. 69, n. 4, p. 569–588, 1999.

DIANESE, J. G.; HARIDASAN, M.; MORAES, T. S. de A. Tolerance to ‘Mal do Rio Doce’, a major disease of *Eucalyptus* in Brazil. **Tropical Pest Management**, v. 30, n. 3, p. 247-252, set, 1984.

DIAS, C. N.; PICOLI, E. A. T.; SOUZA, G. A.; FARAG, M. A.; SCOTTI, M. T.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Phenolics metabolism provides a tool for screening drought tolerant *Eucalyptus grandis* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 08, p. 1016-1025, ago, 2017.

DIAS, C.; PICOLI, E. A. T.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A.; TAVARES, J. F.; FARAG, M. A. Metabolomics characterizes early metabolic changes and markers of tolerant *Eucalyptus* ssp. clones against drought stress. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 212, p. 113715, ago. 2023.

ELLI, E. F.; SENTELHAS, P. C.; HUTH, N.; CARNEIRO, R. L.; ALVARES, C. A. Gauging the effects of climate variability on *Eucalyptus* plantations productivity across Brazil: a process-based modelling approach. **Ecological Indicators**, v. 114, p. 106325, jul. 2020.

FAO, 2023. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat: database – crop production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acessado em: 28 de dezembro de 2023).

FENSHAM, R. J.; HOLMAN, J. E. Temporal and spatial patterns in drought-related tree dieback in Australian Savanna. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, n. 6, p. 1035-1050, dez, 1999.

FERRAZ, T. M., **Ecofisiologia de clones de eucalipto submetidos à restrição hídrica em condições de campo**. 2012. 138p. Tese Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, RJ, 2012.

FONSECA, C. R.; OVERTON, J. McC.; COLLINS, B.; WESTOBY, M. Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients. **Journal of Ecology**, [S.L.], v. 88, n. 6, p. 964-977, dez. 2000.

GOMES, F; MARTINS, N; BARROS, L; RODRIGUES, M. E; OLIVEIRA, Beatriz, P. P.; HENRIQUES, M; FERREIRA, I. C. F. R. Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 515-520, fev. 2018.

IBGE, 2021. **Florestas plantadas no Brasil somam 9,3 milhões de hectares em 2020**. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2021-10/florestas-plantadas-no-brasil-somam-93-milhoes-de-hectares-em-2020>>. Acesso em: 20 de setembro 2022.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual IBÁ 2023**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2023.

JARDIM, J. M.; JADIM, C. M.; COLODETTE, J. L. Understanding the pulping and bleaching performances of *Eucalyptus* woods affected by physiological disturbance. **TAPPI Journal**, n. 11, v. 17, nov, 2018.

JURSKIS, V. Eucalypt decline in Australia, and a general concept of tree decline and dieback. **Forest Ecology and Management**, v. 215, n. 1-3, p. 1-20, ago., 2005.

KHALID, K. A.; SILVA, J. A. T.; CAI, W. Water deficit and polyethylene glycol 6000 affects morphological and biochemical characters of *Pelargonium odoratissimum* (L.). **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 2, p. 159-166, jun. 2010.

LEITE, F. P.; NOVAIS, R. F.; SILVA, I. R.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; MEDEIROS, A. G. B.; VENTRELLA, M. C.; VILLANI, E. M. A. Manganese accumulation and its relation to "eucalyptus shoot blight in the Vale do Rio Doce". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 1, p. 193-204, fev., 2014.

MARCELO, C. R. Determinação da relação siringila/guaiacila em ligninas de *Eucalyptus* spp. por pirólise associada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa - MG, 2007.

MUELLER-DOMBOIS, D. Perspectives for an etiology of stand-level dieback. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, p. 221–243, 1986.

PICOLI, E. A. T.; RESENDE, M. D. V.; ODA, S. Come Hell or High Water: breeding the profile of eucalyptus tolerance to abiotic stress focusing water deficit. **Plant In Challenging Environments**, p. 91-127, 2021. Doi:10.1007/978-3-030-78420-1_5.

RAZOUK, R.; HSSAINI, L.; ALGHOUM, M.; ADIBA, A.; HAMDANI, A. Phenotyping olive cultivars for drought tolerance using leaf macro-characteristics. **Horticulturae**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 939, 13 out. 2022.

RODRIGUES, B. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; DEMUNER, B. José; MAFIA, R. G.; VIDAURRE, G. B. Chemical and kraft pulping properties of young eucalypt trees affected by physiological disorders. **Forests**, v. 13, n. 4, p. 504, 2022.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; DOMINGUES, R. M. A.; OLIVEIRA, C. S. D.; VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R., NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D. Secondary metabolites from *Eucalyptus grandis* wood cultivated in Portugal, Brazil and South Africa. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 95, p. 357-364, 2017.

SILVA, V. L. **Caracterização de ligninas de *Eucalyptus* spp. pela técnica de pirólise associada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas**. 68f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2006.

STAPE, J. L.; BINKLEY, D.; RYAN, M. G. *Eucalyptus* production and the supply, use and efficiency of use of water, light and nitrogen across a geographic gradient in Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 193, n. 1-2, p. 17-31, maio, 2004.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2-2, nov., 2020.

VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, [S.L.], v. 176, n. 4, p. 749-763, 8 nov. 2007.

WALLIS, I. R.; SMITH, H. J.; HENERY, M. L.; HENSON, M.; FOLEY, W. J. Foliar chemistry of juvenile *Eucalyptus grandis* clones does not predict chemical defense in maturing ramets. **Forest Ecology and Management**, v. 260, p. 763–769, 2010.

WHITE, D.; BEADLE, C.; WORLEDGE, D.; HONEYSETT, J.; CHERRY, M. The influence of drought on the relationship between leaf and conducting sapwood area in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. **Trees**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 406-414, 22 jun. 1998.

ZHANG, Y.; WANG, X. Geographical spatial distribution and productivity dynamic change of eucalyptus plantations in China. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, out., 2021.

CAPÍTULO I

PIRÓLISE DE AMOSTRAS DA CASCA E LENHO DE CLONES DIVERGENTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO DISTÚRBO FISOLÓGICO DO EUCALIPTO

RESUMO

O setor florestal contribui com bilhões de dólares na balança comercial do Brasil e do mundo, para o qual as espécies de eucalipto têm uma contribuição significativa. A plasticidade fenotípica é essencial para o sucesso da cultura que encontra desafios como o distúrbio fisiológico do eucalipto. As informações sobre os padrões de acúmulo de metabólitos específicos podem auxiliar na atribuição de um padrão à tolerância a condições de estresse e para o distúrbio fisiológico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar os dados gerados pela pirólise de amostras da casca e lenho de clones divergentes quanto a tolerância ao distúrbio fisiológico do eucalipto. Para isso, realizou-se um experimento em campo, em delineamento de blocos casualizados, no qual foram avaliados 30 clones, dos quais 9 foram selecionados com base no fenótipo divergente para continuidade do trabalho. Três árvores por clone foram amostradas ao longo do fuste nas posições do DAP (diâmetro à altura do peito), 50% e 75% da altura total. As propriedades analisadas foram a concentração de compostos fenólicos, a relação sirigil/guaiacil (S/G) e a avaliação do distúrbio na área de plantio (histórico) e nas plantas amostradas. A pirólise de amostras de eucalipto é rápida e barata, gerando dados que tem potencial para ser utilizados para a compreensão do distúrbio fisiológico do eucalipto. Entretanto, a repetibilidade dos fragmentos químicos gerados foi insatisfatória, sendo necessário a otimização do processamento das amostras. Ainda que a relação S/G e alguns dos resíduos fenólicos de amostras da casca e lenho possam ser associadas a genótipos divergentes quanto a tolerância ao DFE esta abordagem ainda necessita ser aprimorada para seu uso na seleção de clones.

Palavras-chaves: Eucalyptus. Biomarcadores. Melhoramento Florestal. Fenólicos. Relação S/G.

CHAPTER I

PYROLYSIS OF BARK AND TIMBER SAMPLES OF CLONES DIVERGENT REGARDING THE TOLERANCE TO THE EUCALYPTUS PHYSIOLOGICAL DISORDER

ABSTRACT

The forestry sector contributes billions of dollars to Brazil's and the world's trade balance, to which eucalyptus species make a significant contribution. Commercial plantations face challenges such as the physiological disorder of eucalyptus, with its plasticity being essential for the success of the culture. Information about accumulation patterns of specific metabolites can assist in assigning a pattern to tolerance to stress conditions and physiological disturbance. Therefore, the objective of this work is to analyze the pyrolysis of bark and wood samples from clones divergent in terms of tolerance to the physiological disorder of eucalyptus. A field experiment was carried out in a randomized block design, in which 30 clones were evaluated, of which 9 were selected based on the divergent phenotype to continue the work. Three trees per clone were sampled along the stem at the positions of DBH (diameter at breast height), 50% and 75% of the total height. The properties analyzed were the compositions of phenolic compounds, the sirigyl/guaiacyl (S/G) ratio and the assessment of disturbance in the planting area (historical data) and in the sampled trees/clones. Pyrolysis of eucalyptus samples is fast and cheap, generating data that has potential contribution to the comprehension of the physiological disorder of eucalyptus. However, the repeatability of the chemical fragments generated was unsatisfactory. Despite the S/G ratio and some of the phenolic residues can be associated with divergent genotypes in terms of tolerance to DFE based on the analysis of bark and wood samples, this approach needs further amendments to be used as a reference for clone selection.

Keywords: Eucalyptus. Biomarkers. Plant breeding. Phenolics. S/G ratio.

1. INTRODUÇÃO

O setor florestal contribui com bilhões de dólares na balança comercial do Brasil e do mundo (FAO 2023) para o qual as espécies de eucalipto têm uma contribuição significativa (ELLI et al., 2020; ZHANG e WANG, 2021; IBA, 2023; FAO, 2023). O Brasil é um expoente na produção de eucaliptos (IBÁ, 2023), apesar de desafios como o distúrbio fisiológico do eucalipto (DFE) (DIANESE et al., 1984; LEITE et al., 2014; TESHOME et al., 2020).

A plasticidade do eucalipto é essencial para o sucesso da produção (GOMES 2013; VALLADARES et al., 2007; BOOTH, 2013; ANDRADE-BUENO et al., 2020) e está relacionada às estratégias de resposta a condições ambientais que resultem em diferentes níveis de estresse. Abordagens que permitam a expressão da capacidade de resposta em condições climáticas desfavoráveis (BOOTH et al., 2015) e rapidez na avaliação são, portanto, essenciais para a compreensão do DFE, das respostas aos estímulos ambientais e para a seleção de clones mais tolerantes.

Os sintomas associados ao DFE incluem trincamento da casca, perda de dominância apical, emissão de brotações adventícias ao longo do tronco, além de abscisão foliar e a morte da planta (ALFENAS et al., 2009; SILVA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2022). Além as perdas em potencial em stands de plantio, o DFE tem efeitos negativos e diretos na qualidade da madeira e na produção e polpa de celulose (CÂMARA et al. 2018; VIDAURRE et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022). Os efeitos do DFE podem também ser visualizados em nível metabólico. Rodrigues et al. (2022) e Caetano-Madeira et al. (2023) relataram diferenças significativas de metabólitos e do desenvolvimento de clones divergentes quanto a tolerância ao DFE sob condições favoráveis ao distúrbio. Por exemplo, os compostos fenólicos tem potencial capacidade antioxidativa (AGATIA et al., 2012) e podem contribuir com estratégias de respostas a condições de estresse, visto a associação destes metabólitos com a tolerância ao estresse hídrico e ao DFE (DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023; CAETANO-MADEIRA et al., 2023).

A ausência de estudos relacionando características da casca de eucalipto e respostas a estresses abióticos (PICOLI et al., 2021) chama atenção por ser onde parte da sintomatologia do DFE é constatada (ALFENAS et al., 2009; SILVA et al., 2010; ALMEIDA, et al., 2022) e pela facilidade de acesso às amostras. Picoli et al (2021) ressaltaram a importância de biomarcadores proporcionarem uma medida da resposta a fatores ambientais e permitirem a avaliação de um grande número de amostras ou indivíduos. Os autores destacaram que os biomarcadores devem ser informativos para a característica desejada, apresentar baixo custo,

facilidade de avaliação e rapidez de processamento. O estudo dos metabólitos apresenta potencial para identificação marcadores com estas propriedades, devido estes compostos também constituírem uma expressão do fenótipo do organismo em resposta a união de fatores genéticos e ambientais (SILVA, 2020).

A versatilidade e rapidez da pirólise na caracterização da lignina e outros compostos (SILVA 2006; MARCELO 2007; BRUMANO et al., 2020; SILVEIRA JÚNIOR et al., 2022) torna esta técnica atraente para o processamento de um grande número de amostras. A pirólise envolve a quebra de macromoléculas em condições de temperaturas elevadas, demanda pequena quantidade de pouca manipulação previa das amostras (DEL RIO 2005; GUTIÉRREZ et al., 2006). Contar com informações sobre os padrões de acúmulo de metabólitos específicos pode auxiliar na atribuição de um padrão à tolerância a condições de estresse, abrindo caminhos para o desenvolvimento de biomarcadores, aspecto fundamental para programas de melhoramento vegetal (ARBONA et al., 2013; DIOLA; DALOSO; ANTUNES, 2013).

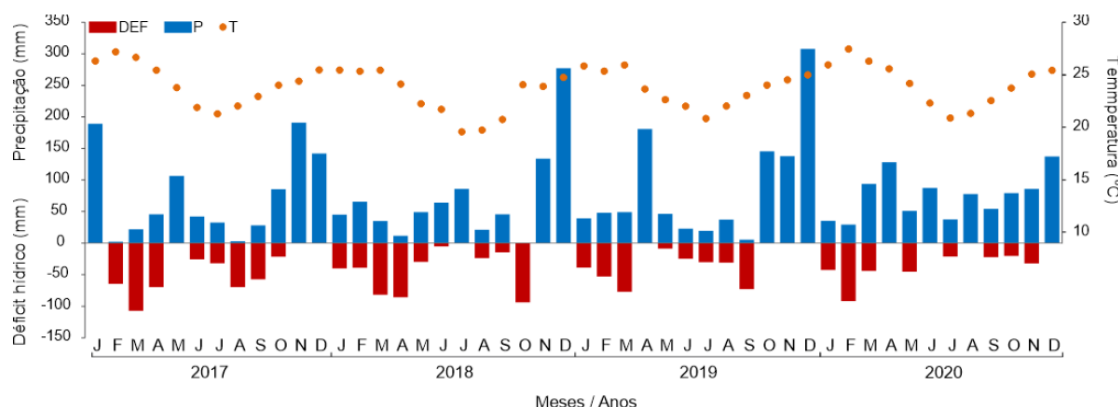
A conversão de biomassa em produtos químicos por meio da pirólise é útil para a caracterização de ligninas que fazem parte da composição da madeira. A relação de resíduos guaiacil (G) e siringil (S) são particularmente relevantes no estudo da lignina e suas propriedades (ZHANG et al., 2012; OHRA-AHO et al., 2013; CHEN et al., 2015). Assim, este estudo teve como objetivo analisar e associar produtos da pirólise de amostras de casca e lenho de eucalipto a partir do pressuposto de uma relação dos fenólicos e frações da lignina com o fenótipo tolerante ao DFE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Local de condução

O plantio experimental avaliado localizado em Mucuri no Sul da Bahia/BR foi conduzido durante os anos de 2015 a 2020. O local possui clima caracterizado como Aw (tropical com inverno seco) e apresentou, entre os anos de 2017 e 2020, temperatura média do ar de 24°C, precipitação de 915 mm ano⁻¹ e déficit hídrico de 380 mm ano⁻¹. Os dados mensais de precipitação, temperatura e déficit hídrico ao longo de 4 anos de plantio são apresentados na Figura 1 (ALMEIDA et al., 2022).

Figura 1 - Dados mensais de temperatura (°C), precipitação pluviométrica (mm) e déficit hídrico (mm) no período de 2017 a 2020 em Mucuri, Bahia, Brasil.



Fonte: ALMEIDA et al. (2022).

1.2 Coleta do material

A coleta do material é vinculada ao projeto de pesquisa “Descrição anatômica de folhas e caules de clones semicomerciais da Suzano S.A.” que tem o objetivo de caracterização e descrição da anatomia da folha, casca e lenho de amostras de clones de interesse da Suzano S.A., mantidos em áreas de plantios comerciais ou experimentais (Figura 2A). A escolha da área foi baseada na proximidade da fábrica e por ser uma área com propósito comercial e experimental, com registro de ocorrência do DFE, utilizada para a avaliação de clones do programa de melhoramento da empresa.

As coletas foram realizadas em parcelas de um experimento instalado em uma área de plantio experimental da Suzano S.A. que apresenta histórico de ocorrência do distúrbio. O delineamento experimental foi composto por 4 blocos para a avaliação de 30 clones, dos quais foram selecionados nove genótipos (clones) de acordo com histórico de incidência do distúrbio nos *stands* comerciais variando de mais tolerante, intermediariamente tolerante e suscetível. Os critérios e classificação dos clones são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Três (3) dos 4 blocos originais foram amostrados, sendo o quarto bloco preservado de acordo com o planejamento do experimento pela empresa. Os blocos foram originalmente compostos por 6 plantas, a partir dos quais uma árvore viva e representativa de cada bloco foi derrubada para amostragem e avaliação em cada unidade experimental designada para a amostragem. Árvores mortas foram desconsideradas para efeito de coleta.

Discos de 5 cm do caule dos nove clones de *Eucalyptus* spp. foram coletadas nas alturas do DAP, 50 e 75% da altura comercial. No momento da coleta, as árvores foram classificadas

quanto à severidade e ocorrência do distúrbio fisiológico nos indivíduos amostrados seguindo os critérios descritos na Tabela 1, de acordo com Almeida et al. (2022). A Suzano S.A. forneceu os dados da ocorrência do distúrbio nos clones em avaliação baseada na classificação média do fenótipo (notas) dos clones de acordo com o histórico de ocorrência de DFE nas áreas comerciais da empresa (Tabela 2).

As amostras de cascas e lenhos secos foram mantidas em cômodo aberto com ventilação natural e sem incidência de luz solar direta (Figura 2B). Após um período de em torno de 5 dias, as amostras foram separadas em cascas e lenho por indivíduo, sendo cada amostra composta constituída pelo material de cada planta nas 3 alturas (DAP, 50% e 75% da altura comercial). As amostras de casca e lenho foram moídas em moinho de facas, peneiradas em condições ambientes, protegidas da luz solar e até equilíbrio higroscópico. As amostras moídas foram fracionadas e peneiradas em sistema vibratório com peneiras padrão e a fração entre 40-60 mesh (0,425–0,250 mm) coletada para análise química nutricional. Parte das amostras foram reservadas, secas em estufa a 50-55 °C até peso constante e mantidas em recipientes fechados até a análise (Figura 2D). As demais análises nutricionais, crescimento e de anatomia da casca serão discutidos em outro momento.

1.3 Pirólise

A relação siringil/guaiacil foi realizada por meio da cromatografia líquida após oxidação da serragem da madeira e casca com nitrobenzeno, conforme Lin e Dence (1992). A separação dos produtos da oxidação por nitrobenzeno foi alcançada utilizando-se uma coluna LC-18. A fase móvel usada foi acetonitrila/água (1:6 v/v) com pH igual a 2,6, tamponado com ácido trifluoroacético (TFA). A análise no ultravioleta foi realizada no comprimento de onda de 280 nm, na temperatura de 40 °C, utilizando fluxo de 1 mL min⁻¹, injeção 20 µl; padrão cromatográfico: padrões utilizados foram vanilina, para a unidade guaiacila e siringaldeído, para unidade siringila. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Tabela 1 - Classificação dos clones de *Eucalyptus* em relação à severidade do distúrbio fisiológico baseado na observação de sintomas.

Nível	Sintomas
Nível 0	Plantas assintomáticas.
Nível 1	Lesão superficial deprimida, trincamento e ligeiro descolamento da casca (“escamação”), aleatoriamente distribuídos no tronco ou nos galhos.
Nível 2	Queima do terço basal da copa, trincamento da casca e intumescimento em pontos específicos do caule ou aleatoriamente distribuídos ao longo da haste principal ou dos ramos.
Nível 3	Seca de ponteiros, bifurcação do tronco principal, super brotação, formação de casca corticosa e liberação de casca (periderme exofilática) e edemas (calosidade ou lixa) foliares.
Nível 4	Secamento da copa e morte da planta.

Fonte: ALMEIDA et al. (2022).

Tabela 2 – Relação das amostras, fenótipo e espécies dos clones comerciais e informações do histórico de ocorrência do DFE nos campos de plantio comercial da Suzano S.A.

Clone/amostra	fenótipo	espécie/cruzamento
1	tolerante	<i>E. urophylla</i>
2	tolerante	<i>E. urophylla</i>
3	tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
4	semi-tolerante	<i>E. grandis</i>
5	semi-tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
6	semi-tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
7	mod-suscetível	<i>E. grandis</i>
8	Suscetível	<i>E. urophylla</i>
9	suscetível	<i>E. grandis</i>

Figura 2 – Visão da A) área de plantio experimental/Comercial, Itabatã, Bahia, Brasil; e B) secagem e pré-processamento das amostras de casca e lenho de clones comerciais de eucaliptos da Suzano S.A. C) secagem ao ar, moagem e D) armazenamento após secagem, das amostras de casca e lenho de eucalipto.



As amostras compostas de casca e lenho (constituídas das seções de caule no DAP, 50% e 75% da altura comercial, respectivamente) foram submetidas a pirólise em um Single-Shot Pyrolyzer (Frontier Laboratories Ltd., Fukushima, Japão) conectado a um sistema GC-2010 Plus com um GCMS-QP2010 Ultra Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japão) e uma válvula de interface a 290°C. A pirólise rápida foi conduzida a temperaturas entre 350 e 600 °C. Os parâmetros de operação do GC foram: temperatura do injetor de 250 °C; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm) (Restek, Bellefonte, PA, EUA); temperatura inicial do forno de 40 °C por 1 min, aquecida a 6 °C/min até 280 °C e mantida por 15 min; e gás de arraste hélio (1 mL/min) em modo split na proporção de 20:1 (SILVEIRA JÚNIOR et al., 2021). Os experimentos foram realizados em duplicata, e os compostos formados foram identificados usando o Programa de pesquisa espectral de massa (2.0) do Instituto Nacional de padrões e tecnologia (NIST) juntamente com o banco de dados espectral de massa NIST/EPA/NIH (NIST 11) e Biblioteca

de dados espectrais de massa Wiley 7v100. O rendimento percentual de todos os pirolíticos produtos formados foi calculado com base na quantidade de biomassa pirolisada (em torno de 0,5 mg) para padronização dos compostos formados conteúdo, e seguido pelo “Método de Normalização Interna de Áreas de Pico” para análise quantitativa Guiochon e Guillemin, 1998) considerando a área do pico do componente alvo como uma proporção da área total de todos os picos detectados.

1.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, média e desvio padrão, ou análise de variância e teste de média quando possível. Realizando a análise de variância e, quando verificados efeitos significativos, foram realizados testes de Tukey ($p < 0,05$) para comparar as médias dos tratamentos. A análise de correlação de Spearman foi realizada entre as variáveis relação S/G nas amostras de casca e lenho e com a nota de DFE observada para a árvore amostrada, dados históricos de DFE nas áreas de produção e pedigree (espécie/híbrido) dos clones. As análises estatísticas foram realizadas nos softwares Jamovi (The Jamovi Project, 2022) e R (R Core Team, 2021).

EV

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação das notas da intensidade (FDE) do DFE disponibilizados pela empresa (Tabela 4) refletem uma média de levantamento de dados empíricos ao longo diferentes anos e áreas de cultivo. A avaliação das médias das notas de DFE avaliadas nas amostras (plantas derrubadas para amostragem) (Figura 3) são coerentes com os dados observados pela empresa. Tanto o referencial empírico (dados das notas atribuída aos clones em plantios comerciais da empresa e de ocorrência do distúrbio) como as notas atribuídas às plantas amostradas foram utilizadas como referência de avaliação dos clones.

Vale ressaltar que esta escala de notas é relativa. Inexiste um clone totalmente tolerante dentro dos materiais avaliados, haja visto que as plantas amostradas dos materiais considerados tolerantes apresentaram uma nota média semelhante à dos moderadamente tolerantes, mesmo que significativamente menor do que a nota média dos suscetíveis (Figura 3). Algumas das amostras dos clones tolerantes e semitolerantes apresentaram nota 1. As notas atribuídas aos clones não apresentaram distribuição normal (Apêndice, Tabela 2), mas apresentou diferença significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis em nível de 5% (Apêndice, Tabela 4)

indicando a diferença de comportamento ou fenótipo dos clones. Este comportamento está de acordo com a complexidade dos fatores associados à ocorrência do distúrbio e a observação de que a ocorrência e intensidade do distúrbio pode variar entre as árvores de um mesmo clone em um mesmo plantio.

As parcelas foram, originalmente, constituídas por 6 plantas cada, das quais algumas das parcelas apresentavam plantas mortas (dados não apresentados). Como haveria viés para qualquer que fosse o critério para a amostragem, foram escolhidas árvores representativas e vivas dentro de cada parcela. Árvores mortas foram desconsideradas no momento da coleta. As notas de DFE das amostras (Figura 3) representam, portanto, uma aproximação média da nota das plantas nas parcelas amostradas. Esta diferença evidenciam a complexidade de fatores para a expressão do distúrbio (MUELLER-DOMBOIS 1986; CUNNINGHAM et al., 1999; FONSECA et al., 2000; CARNICER et al., 2011) bem como uma penetrância e expressividade parcial para a característica tolerância ao distúrbio fisiológico do eucalipto.

Nas Tabelas 5 e 6 (Apêndice) são apresentados somente os compostos identificados em mais de 10 das 27 amostras de casca e lenho. Exceção feita ao catecol e pirulvaldeido na casca e trans-4 propenilsiringol no lenho (Apêndice, Tabelas 5 e 6) devido a estarem presentes somente nos genótipos tolerantes ou suscetíveis. A análise dos dados gerados na pirólise se baseia no estudo de fragmentos moleculares resultados da quebra de amostras submetidas a altas temperaturas (WAMPLER 1995, 1999; POUSTMA, 2000). Particularmente, a pirólise da lignina gera fenóis mais simples a partir dos quais pode-se identificar as subunidades que compõe a molécula antes da sua quebra (RALPH e HATFIELD 1991).

Na relação de siringil/guaiacil na casca, houve diferença significativa (Tabela 3) entre os clones, sendo os clones tolerante com um menor valor (1,21) comparada a dos clones moderadamente tolerante e susceptíveis (1,84 e 1,99 respectivamente) (Tabela 4). Como a ocorrência do DFE não ocorre em 100% das plantas em campo e nem nas árvores amostradas, essa diferença de expressão do distúrbio pode ter contribuído para a não significância dos dados. Estes resultados servem, portanto, apenas como uma referência e observação. Neiva et al. (2020), analisando a lignina de cascas de árvores e sua estrutura química, relatou relações S/G média de 2,5 para *E. globulus*. Os autores ressaltam que a alta relação S/G indicam uma lignina mais reativa e mais fácil de despolimerização. Independente da reatividade da lignina, os valores observados para os clones de *E. grandis* e *E. urophylla* em nosso trabalho foram menores do que os de Neiva et al. (2020).

Santos et al. (2017) verificaram diferenças na proporção de fenólicos de acordo com a espécie, procedência e estresse sofrido pelas plantas. A relação S/G pode ser uma característica

inerente à espécie, considerando que os genótipos avaliados são de *E. grandis*, *E. urophylla* e seu híbridos, entretanto, a mesma relação pode variar concomitante com outras características que em conjunto podem contribuir com a tolerância ao DFE. A hipótese de que a variação relativa, e não os valores absolutos, da relação S/G possam ser associadas ao fenótipo de tolerância carece de mais estudos e do teste concomitante de um maior número de espécies ou híbridos de eucalipto. Para isto também é necessário levar em consideração o local onde as plantas se desenvolvem visto a origem geográfica também ter influenciado a composição dos compostos fenólicos (SANTOS et al., 2017).

A relação S/G não apresentou diferença estatística (Tabela 3) para as amostras de lenho, em que os clones tolerantes, moderadamente tolerante e suscetíveis apresentaram valores semelhantes entre si (Tabela 4). A relação S/G das amostras de lenho foi superior à das amostras de casca, independentemente do fenótipo de tolerância ou resistência ao DFE. Este menor nível de discriminação também pode estar associado a ausência na detecção de compostos que podem ter influência no resultado final. Os demais resíduos detectados na pirólise de amostras de casca e lenho apresentaram diferenças numéricas, entretanto, sem repetibilidade dentro de amostras dos mesmos clones ou fenótipo de DFE. A falha na detecção ou ausência de alguns dos resíduos em praticamente todas as amostras, põe em xeque a validade do uso dos demais compostos identificados na compreensão ou identificação dos genótipos divergentes quanto ao DFE. Outra alternativa é que o processamento das amostras ou a quantidade de amostra para a análise por pirólise possa implicar em outro fator de variação dos dados.

No trabalho de Almeida et al. (2022), analisando as propriedades da madeira como potenciais biomarcadores de tolerância a distúrbios fisiológicos, foi observado que para a relação siringil/guaiacil os clones *E. grandis* e o híbrido *E. grandis x E. urophylla* apresentaram menor relação S/G em clones com sintomas de DFE. Ressaltando que a forma de como foi obtida essas concentrações foram diferentes. Neste mesmo trabalho com clones de fenótipo contrastante quanto ao DFE a relação S/G foi obtida pelo oxidação da serragem em nitrobenzeno e, ainda que uma ordenação dos clones semelhante, a relação S/G foi aproximadamente a metade dos valores obtidos por pirólise.

Devido ao relato de fenólicos presentes nas folhas de eucaliptos divergentes quanto a tolerância ao déficit hídrico (DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023) e DFE (CAETANO-MADEIRA et al., 2023), é possível que a análise isolada de compostos fenólicos por pirólise como o 4-metilguaiacol seja viável. Deve-se, entretanto, observar a repetibilidade para a obtenção destes dados. As amostras de lenho dos clones tolerantes apresentaram valores médios deste composto (1,49) superiores aos atribuídos as amostras de clones moderadamente tolerante

(0,76) e os suscetível (0,87) (Apêndice, Tabela 6). O mesmo padrão foi observado para as amostras de casca (Apêndice, Tabela 5). De acordo com Zabka e Pavela (2013) esse composto fenólico se destaca por apresentar propriedades fungicidas, e também por ser um composto volátil extraído da madeira e originado como produto da degradação da lignina (GHADIRIASLI et al., 2019).

As plantas produzem uma grande variedade desses metabolitos secundários. Considerando a diversidade química dos compostos fenólicos também é esperado que desempenhem funções diversas e importantes nos vegetais. Em particular, são tidos como altamente específicos e desempenham papel importante na evolução das plantas (BORGES e AMORIM, 2020), como a atividade antioxidante (AGATIA et al., 2012; SANTOS et al., 2017).

Vários pesquisadores já comprovaram a importância de se estudar esses compostos fenólicos em várias espécies e em ambientes de estresses. Velloso et al. (2009) observaram que o estresse hídrico e variações de temperatura causaram alterações na produção desses metabolitos. Selmar e Kleinwächter (2013) afirmam que as concentrações de metabolitos secundários aumentam significativamente em planta em condições de seca. Trabalhos que avaliaram a resposta de plantas medicinais submetidas ao estresse hídrico demonstraram significativa influência na produção de compostos secundários (BORTOLO et al., 2009; ALVARENGA et al., 2011). De acordo com Sousa e Sousa (2017), as plantas submetidas ao estresse hídrico tendem a produzir mais metabolitos secundários, principalmente, os compostos fenólicos e isso se deve a uma forma de defesa que as plantas desenvolvem para se adaptar ao estresse hídrico.

A pirólise rápida da lignina pode produzir monômeros dos compostos fenólicos em diferentes condições de reação (HU et al., 2018; ZHAO, et al., 2021). Esta pode ser uma estratégia eficaz para sua valorização por causa da fraca estabilidade da ligação em altas temperaturas e por ser um processo que pode converter eficientemente biomassa lenhosa (LENG et al., 2022; MOHAN et al., 2006). Por outro lado, a estrutura altamente polimerizada e complexa da lignina pode ser uma dificuldade para esta análise (YUAN et al., 2022).

Na pirólise, espera-se que materiais genéticos (clones), com maior teor de lignina e maior proporção de unidades guaiacil, sejam mais resistentes à degradação, ocasionando maior eficiência da transformação da madeira em carvão vegetal (ARAÚJO, 2015). Sendo a relação siringil/guaiacil podendo ser estabelecida como um parâmetro global da qualidade tecnológica da madeira, capaz de auxiliar nos processos de seleção de clones de eucalipto (SANTOS, 2010). Castro et al. (2013) utilizaram a relação siringil/guaiacil da lignina da madeira como parâmetro de classificação de clones de *Eucalyptus* para a finalidade energética.

As diferenças nos teores e estrutura de lignina entre madeira e casca têm sido relatadas em poucos estudos, Lourenço et al. (2015) estudando a caracterização de lignina em cerne, alburno e casca de *Tectona grandis* utilizando Py–GC–MS, observaram que a lignina da casca demonstrou ter uma composição semelhante à lignina de madeira e com uma relação S/G também semelhante. Costa et al. (2014) avaliando o impacto do processamento químico na lignina da madeira de *E. globulus* e comparação com lignina da casca, verificaram que a lignina da casca é semelhante à lignina da madeira. Ambos autores ressaltaram a necessidade de mais conhecimentos dos componentes estruturais, principalmente, da casca. A variação dos compostos fenólicos também resultou em um diferente potencial antioxidante das amostras de *E. grandis* de acordo com a procedência das amostras (SANTOS et al., 2017). Isto mostra um efeito do ambiente na produção dos fenólicos pelas plantas e, por sua vez, podendo contribuir com as respostas destes indivíduos a gatilhos de estresse ambiental.

A mensuração de variações de fenólicos podem atuar como biomarcadores de estresses ao fornecem uma ferramenta objetiva para detectar, monitorar e informar como no conteúdo de metabólicos que são marcadores informativos e sendo capazes de discriminar condições de estresse e não estresse (MUNNÉ-BOSCH e VILLADANGOS, 2023). Além disso, há o potencial de uma estimativa rápida e de baixo custo do estado fisiológico geral de uma planta estressada.

As notas atribuídas às plantas amostradas (FDO) estão correlacionadas de forma significativa com as notas atribuídas aos clones de acordo com os dados empíricos e observações nas áreas de plantio comercial (FDE) (Tabela 7). Apesar dos dados de pirólise serem menos informativos devido a falha na identificação dos compostos, verificamos que há uma correlação positiva e significativa entre a relação S/G da casca com FDE, sugerindo a relação dos fenólicos na casca apresentar um potencial de informação. Deve-se considerar que o mesmo não foi observado para a relação S/G do lenho (SGW). Observa-se que quanto mais compostos deixaram de ser identificados na casca, maior foi a nota do distúrbio. A relação e identificação destes compostos pode ser importante para a identificação ou delinear novos aspectos relacionados a tolerância ao DFE. A falha na identificação destes compostos apresenta-se como aspecto negativo para o uso da pirólise, sendo necessário a utilização de outras técnicas visando maior segurança das análises. Observamos também a ausência de uma correlação significativa entre o número de compostos detectados e os não identificados na casca, enquanto os mesmos valores observados para o lenho apresentaram uma correlação positiva. Este é um comportamento que aponta um comportamento diferente dos compostos detectados na casca e no lenho (Tabela 7).

As maiores notas de DFE para as maiores razões de fragmentos de siringil em relação guaiacil, pode ser relacionado aos efeitos desta relação na composição da lignina e na parede celular de células lignificadas no floema, como células de esclerênquima. Alternativamente, estes compostos podem estar presentes em uma forma solúvel.

Em amostras de lenho, a menor relação S/G da lignina pode ser relacionada ao maior rendimento gravimétrico da carbonização (SOARES et al., 2014; PEREIRA et al., 2013). O significado desta relação nas amostras de casca ainda precisa ser definido. Entretanto, com base em amostras de lenho, a relação S/G não se correlacionaram com a lignina solúvel, lignina insolúvel, lignina total, teor dos componentes elementares C, H e O, teor de extrativos e poder calorífico superior da madeira (PCS) (ARAÚJO et al., 2016). De acordo com estes autores, a relação S/G apresentou correlação positiva e significativa com o teor de nitrogênio e ao teor de materiais voláteis no carvão vegetal. Vale ressaltar que a concentração de nitrogênio nas folhas foi uma das características que puderam ser relacionadas positivamente à tolerância ao déficit hídrico (CORRÊA et al., 2023) e distúrbio do eucalipto (CORRÊA et al., 2017; CAETANO-MADEIRA et al., 2023), a partir de amostras foliares.

Figura 3 - Distribuição das notas para ocorrência de DFE, nas amostras dos clones com os fenótipos tolerantes, moderadamente tolerantes e suscetíveis. (Dados coletados a partir dos indivíduos avaliados em área experimental da Suzano A.S., dados avaliados no momento da coleta a partir do indivíduo coletado representativo de uma parcela avaliada).

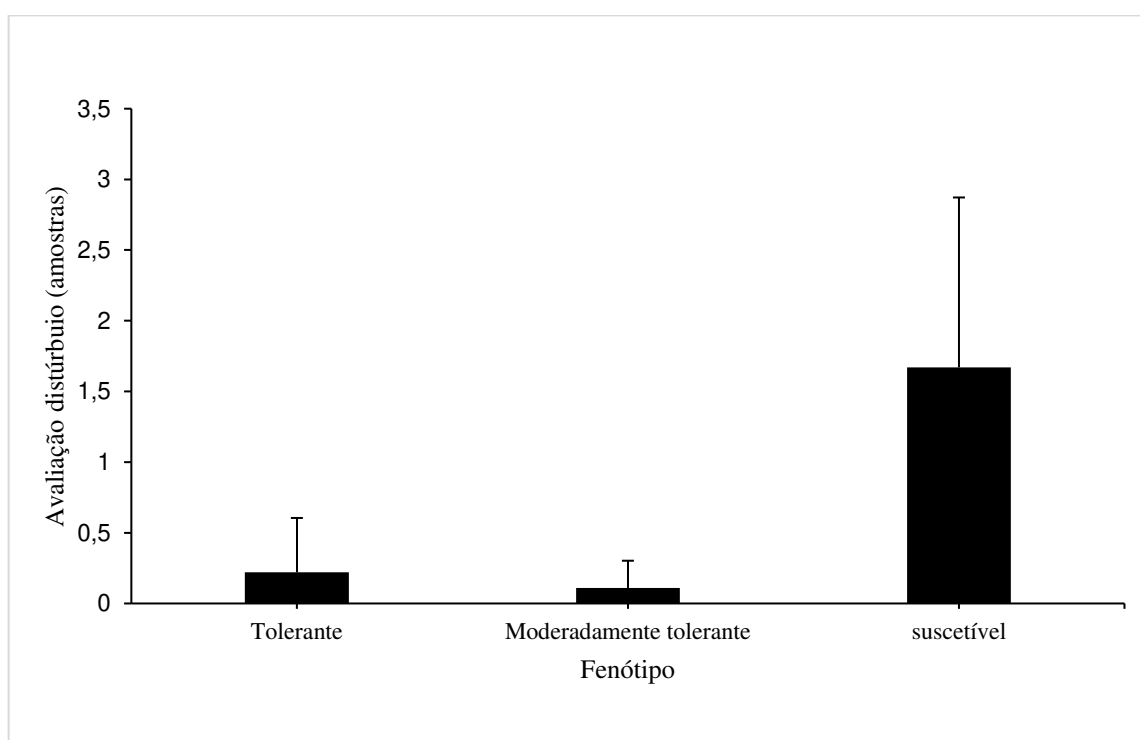


Tabela 3 - Resumo da análise de variância das notas de DFE de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial (FDE), notas observadas para as plantas amostradas (FDO), a relação siringil/guaiacil da casca (SGB) e siringil/guaiacil no lenho (SGW).

FV	GL	F		
		FDO	SGB	SGW
Fenótipos	2	11,982**	7,339**	2,694 ^{ns}
Blocos	2	0,0001 ^{ns}	2,124 ^{ns}	1,642 ^{ns}
CV (%)		29,50	27,38	36,91

^{ns} não significativo, * significativo a 5%, ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, CV: coeficiente de variação.

Tabela 4 – Relação das notas de DFE de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial (FDE), notas observadas para as plantas amostradas (FDO) e a relação siringil/guaiacil da casca (SGB) e siringil/guaiacil no lenho (SGW) dos fenótipos de eucalipto divergentes quanto a ocorrência de DFE. Fenótipos seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Fenótipos	FDO	SGB	SGW
Tolerante	0,22a	1,21a	4,38a
Moderadamente tolerante	0,11a	1,84b	5,39a
Suscetível	1,67b	1,99b	6,58a

Tabela 7 – Correlações de Spearman entre as notas observadas para as plantas amostradas (FDO), notas de DFE de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial (FDE) e a relação S/G (SGB e SGW), número de compostos detectados (BC e WC) e número de compostos detectados e não identificados (BNI e WNI), na casca (B) e no lenho (W), respectivamente.

	FDE	FDO	SGB	BNI	BC	SGW	WNI	WC
FDE	—							
FDO	0.602 ***	—						
SGB	0.542 **	0.256	—					
BNI	-0.595 **	-0.412 *	-0.411 *	—				
BC	-0.300	-0.546 **	-0.548 **	0.375	—			
SGW	-0.326	-0.271	0.039	-0.134	0.028	—		
WNI	-0.420 *	-0.497 **	0.290	0.279	-0.053	0.271	—	
WC	-0.150	-0.217	0.309	-0.031	-0.106	0.240	0.677 ***	—

Nota. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

4. CONCLUSÕES

A pirólise de amostras de eucalipto é rápida e barata, gerando dados que tem potencial para contribuir para a compreensão do distúrbio fisiológico do eucalipto;

A repetibilidade dos fragmentos químicos gerados é falha;

A relação S/G e alguns dos resíduos fenólicos pode ser associada a genótipos divergentes quanto a tolerância ao DFE com base na análise de amostras de casca e lenho;

A relação S/G apresentou correlação positiva e significativa com as notas de DFE esperadas para os clones nas áreas de plantio comercial.

REFERÊNCIAS

AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67 – 76, 2012.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2ª Edição, Editora UFV, Viçosa, MG, 500p, 2009.

ALMEIDA, M. N. F.; PICOLI, E. A. T.; MOULIN, J. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ZAUZA, E. A. V.; LOOS, R. A.; HALL, K. B.; GOMES, D. S.; CONCEIÇÃO, G. J.; RODRIGUES, P. D.; VIDAURRE, G. B. Propriedades da madeira como potenciais biomarcadores de tolerância a distúrbios fisiológicos: comparação de genótipos de eucalipto divergentes. **Scientia Forestalis**, v. 50, e3864, jul, 2022.

ALVARENGA, I. C. A.; VALADARES, R. V.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, F. G.; FIGUEIREDO, L. S. D.; KOBAYASHI, M. K. Water stress before harvest of pepper rosmarin. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 46, v.7, p. 706-711, 2011.

ANDRADE-BUENO, I. G. A.; PICOLI, E. A. T.; ISAIAS, R. M. S.; LOPES-MATTOS, K. L. B.; CRUZ, C. D.; KUKI, K. N.; ZAUZA, E. A. V. Wood anatomy of field grown eucalypt genotypes exhibiting differential dieback and water deficit tolerance. **Current Plant Biology**, [S.L.], v. 22, p. 100136, jun. 2020.

ARAÚJO, A. C. C.; TRUGILHO, P. F.; NAPOLI, A.; BRAGA, P. P. C.; LIMA, R. V.; PROTÁSIO, T. P. Efeito da relação siringil/guaiacil e de fenóis derivados da lignina nas características da madeira e do carvão vegetal de *Eucalyptus* spp. **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 110, jun. 2016.

ARAÚJO, A. C. **Composição química monomérica da lignina da madeira de *Eucalyptus* spp. Para produção de carvão vegetal**. 2015. 85 p. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia da madeira) - Universidade Federal de Lavras, 2015.

ARBONA, V.; MANZI, M.; DE OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 4885-4911, 2013.

AZADFAR, M.; GAO, A. H.; BULE, M. V.; CHEN, S. Structural characterization of lignin: a potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 75, p. 58-66, abr. 2015.

BARBOSA, L. C. A; MALTHA, C. R. A; SILVA, V. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). **Química Nova**, v. 31, v. 8, p. 2035-2041, 2008.

BOOTH, T. H.; BROADHURST, L. M.; PINKARD, E.; PROBER, S. M.; DILLON, S. K.; BUSH, D.; PINYOPUSARERK, K.; DORAN, J. C.; IVKOVICH, M.; YOUNG, A. G. Native forests and climate change: lessons from eucalypts. **Forest Ecology and Management**, [S.L.], v. 347, p. 18-29, jul. 2015.

BOOTH, Trevor H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 28-34, ago. 2013.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de planta. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BORTOLO, D.; MARQUES, P.; PACHECO, A. Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, n. 11, v. 4, p. 435-441, 2009.

BRUMANO, G. C.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A., BARBOSA, B. M.; BORGES GOMES, F. J. Investigation of eucalypt and pine wood acid-soluble lignin by Py-GC-MS. **Holzforschung**, vol. 74, no. 2, 2020, pp. 149-155.

CAETANO-MADEIRA, D. D.; OMENA-GARCIA, R. P.; ELERATI, T. L.; LOPES, C. B. S.; CORRÊA, T. R.; SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, L. A.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; NUNES-NESI, A. COSTA W. G. PICOLI, E. A. T. Metabolic, nutritional and morphophysiological behavior of eucalypt genotypes differing in dieback resistance in field when submitted to PEG-induced water deficit. **Agronomy**, v. 13, n. 5, p. 1261, abr. 2023.

CÂMARA, A. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; BOBADILHA, G. S.; VIDAURRE, G. B.; TOMAZELLO FILHO, M.; SOLIMAN, E. P. Physiological disorders affecting dendrometric parameters and *Eucalyptus wood* quality for pulping wood. **CERNE**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2018.

CARNICER, J.; COLL, M.; NINYEROLA, M.; PONS, X.; SÁNCHEZ, G.; PEÑUELAS, J. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 4, p. 1474-1478, 10 jan. 2011.

CASTRO, A. F. N. M.; CASTRO, R. V. O.; CARNEIRO, A. C. O.; LIMA, J. E.; SANTOS, R. C.; PEREIRA, B. L. C.; ALVES, I. C. N. Análise multivariada para seleção de clones de eucalipto destinados à produção de carvão vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 627-635, jun. 2013.

CASTRO, A. F. N. M.; CASTRO, R. V. O.; CARNEIRO, A. C. O.; LIMA, J. E.; SANTOS, R. C.; PEREIRA, B. L. C.; ALVES, I. C. N. Análise multivariada para seleção de clones de eucalipto destinados à produção de carvão vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 627-635, 2013.

CHEN, L.; WANG, X.; YANG, H.; LU, Qiang; L D.; YANG, Q.; CHEN, H. Study on pyrolysis behaviors of non-woody lignins with TG-FTIR and Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.L.], v. 113, p. 499-507, maio 2015.

CHOW, P. S.; LANDHAUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1129-1136, 1 out. 2004.

CORRÊA, T. R.; PICOLI, E. A. D. T.; SOUZA, G. A. D.; CONDÉ, S. A.; SILVA, N. M.; LOPES M., K. L. B.; RESENDE, M. D. V. D.; ZAUZA, E. A. V.; ODA, S. Phenotypic markers in early selection for tolerance to dieback in *Eucalyptus*. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 130-138, 2017.

COSTA. C. A. E.; PINTO. P. C. R.; RODRIGUES, A. E. Evaluation of chemical processing impact on *E. globulus* wood lignin and comparison with bark lignin. **Industrial Crops and Products**, v, 61, p. 479-491, 2014.

CUNNINGHAM, S. A.; SUMMERHAYES, B.; WESTOBY, M. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. **Ecological Monographs**, v. 69, n. 4, p.:569–588, nov., 1999.

DEL RÍO, José C.; GUTIÉRREZ, A.; HERNANDO, M.; LANDÍN, P.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, Á. T. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.L.], v. 74, n. 1-2, p. 110-115, ago. 2005.

DIANESE, J. G.; HARIDASAN, M.; MORAES, T. S. de A. Tolerance to ‘Mal do Rio Doce’, a major disease of *Eucalyptus* in Brazil. **Tropical Pest Management**, v. 30, n. 3, p. 247-252, set, 1984.

DIAS, C. N.; PICOLI, E. A. T.; SOUZA, G. A.; FARAG, M. A.; SCOTTI, M. T.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Phenolics metabolism provides a tool for screening drought tolerant *Eucalyptus grandis* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 08, p. 1016-1025, ago, 2017.

DIAS, C.; PICOLI, E A. T.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A.; TAVARES, J. F.; FARAG, M. A. Metabolomics characterizes early metabolic changes and markers of tolerant *Eucalyptus* ssp. clones against drought stress. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 212, p. 113715, ago. 2023.

DIOLA, V.; DALOSO, D. M.; ANTUNES, W.C. Metabolômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHENETO, R. (Eds.). **Ômicas 360°: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. Cap. 8, p.181-208.

ELLI, E. F.; SENTELHAS, P. C.; HUTH, N.; CARNEIRO, R. L.; ALVARES, C. A. Gauging the effects of climate variability on Eucalyptus plantations productivity across Brazil: a process-based modelling approach. **Ecological Indicators**, v. 114, p. 106325, jul. 2020.

FAO, 2023. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Faostat: database – crop production. Available at: <http://faostat.fao.org/>. acessado em: 28 de dezembro de 2023.

FENSHAM, R. J.; HOLMAN, J. E. Temporal and spatial patterns in drought-related tree dieback in Australian Savanna. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, n. 6, p. 1035-1050, dez, 1999.

FONSECA, C. R.; OVERTON, J. M.; COLLINS, B.; WESTOBY, M. Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients. **Journal of Ecology**, [S.L.], v. 88, n. 6, p. 964-977, dez. 2000.

G. GUIOCHON, C. L. GUILLEMIN, Chapter 13 **Quantitative Analysis by Gas Chromatography Basic Problems, Fundamental Relationships, Measurement of the Sample Size**, in: G. Guiochon, C.L. Guillemin (Eds.) *Journal of Chromatography Library*, Elsevier 1988, pp. 563-586.

GHADIRIASLI, R.; LORBER, K.; WAGENSTALLER, M.; BUETTNER, A. Smoky, Vanilla, or Clove-Like? **Acs Symposium Series**, p. 43-54, jan. 2019.

GOMES, A. F. **Avaliação das características da madeira e da polpa de *Eucalyptus* mediante a aplicação de métodos não destrutivos na árvore viva**. 2007. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GOMES, L. M. L. **Morphological characteristics of eucalypt clones associated to water restrictions**. 2013. 37 f. Dissertação (Mestrado em Fertilidade do solo e nutrição de plantas; Gênese, Morfologia e Classificação, Mineralogia, Química) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, C. M. Caracterização tecnológica, para produção de celulose, da nova geração de clones de Eucalyptus no Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 129-137, jan./fev. 2005.

GUEDES, R. E.; LUNA, A. S.; TORRES, A. R. Operating parameters for bio-oil production in biomass pyrolysis: a review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 129, p. 134-149, jan., 2018.

GUTIÉRREZ A; RODRÍGUEZ, I. M., DEL RÍO, J.C. Chemical characterization of lignina fractions in industrial hemp blast fibers used for manufacturing high-quality papers pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 54, p.2038-2144, 2006.

HU, J.; WU, S.; JIANG, X.; XIAO, R. Structure–Reactivity Relationship in Fast Pyrolysis of Lignin into Monomeric Phenolic Compounds. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 2, p. 1843-1850, jan. 2018.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual IBÁ 2023**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2023.

JARDIM, J. M.; JADIM, C. M.; COLODETTE, J. L. Understanding the pulping and bleaching performances of Eucalyptus woods affected by physiological disturbance. **TAPPI Journal**, n. 11, v. 17, nov, 2018.

JURSKIS, V. Eucalypt decline in Australia, and a general concept of tree decline and dieback. **Forest Ecology and Management**, v. 215, n. 1-3, p. 1-20, ago., 2005.

LEITE, F. P.; NOVAIS, R. F.; SILVA, I. R.; BARROS, N. F.; NEVES, J. C. L.; MEDEIROS, A. G. B.; VENTRELLA, M. C.; VILLANI, E. M. A Manganese accumulation and its relation to "eucalyptus shoot blight in the Vale do Rio Doce". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 1, p. 193-204, fev., 2014.

LENG, E.; GUO, Y.; CHEN, J.; LIU, S.; E, J.; XUE, Y. A comprehensive review on lignin pyrolysis: mechanism, modeling and the effects of inherent metals in biomass. **Fuel**, [S.L.], v. 309, p. 122102, fev. 2022.

LIMA, C. L. **Variação do ângulo microfibrilar e do conteúdo de lignina na parede celular das fibras da madeira de clones de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla***. 51p. 2015. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

LIN, H.-C.; TSAI, S.-H.; CHEN, C.-S.; CHANG, Y.-C.; LEE, C.-M.; LAI, Z.-Y.; LIN, C.-M. Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 75, n. 6, p. 1416-1425, mar. 2008.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**, Berlin: Springer Verlag, 1992. 578p.
LOURENÇO, A.; NEIVA, D. M. GOMMINHO, J. MARQUES, A. V. PEREIRA, H. Characterization of lignin in heartwood, sapwood and bark from *Tectona grandis* using Py–GC–MS/FID. **Wood Science and Technology**, v, 49, p. 159–175, nov., 2015.

MARCELO, C. R. **Determinação da relação siringila/guaiacila em ligninas de *Eucalyptus* spp. por pirólise associada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas**. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2007.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: a critical review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, mar. 2006.

MUELLER-DOMBOIS, D. Perspectives for an etiology of stand-level dieback. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, p. :221–243, 1986.

MULLEN, C. A. e BOATENG, A. A. Catalytic pyrolysis-GC/MS of lignin from several sources. **Fuel Processing Technology**, v. 91, n. 11, p. 1446-1458, 2010.

MUNNÉ-BOSCH, S.; VILLADANGOS, S. Cheap, cost-effective, and quick stress biomarkers for drought stress detection and monitoring in plants. **Trends in Plant Science**, v. 28, n. 5, p. 527-536, may., 2023.

NARON, D. R.; COLLARD, F. X.; TYHODA, L.; GÖRGENS, J. F. Influence of impregnated catalyst on the phenols production from pyrolysis of hardwood, softwood, and herbaceous lignins. **Industrial Crops and Products**, [S.L.], v. 131, p. 348-356, maio 2019.

NEIVA, D. M.; RENCORET, J.; MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; GOMINHO, J.; PEREIRA, Helena; R., J. C. Lignin from Tree Barks: chemical structure and valorization. **ChemSusChem**, v. 13, n. 17, p. 4537-4547, jun. 2020.

OHRA-AHO, T.; GOMES, F. J. B.; COLODETTE, J. L.; TAMMINEN, T. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.L.], v. 101, p. 166-171, maio 2013.

PEREIRA, B. L. C.; CARNEIRO, A. C. O.; CARVALHO, A. M. M. L.; COLODETTE, J. L.; OLIVEIRA, A. C.; FONTES, M. P. F. Influence of chemical composition of *Eucalyptus* wood on gravimetric yield and charcoal properties. **Bioresources**, Railegh, v. 8, n. 3, p. 4574-4592, 2013.

PICOLI, E. A. T.; RESENDE, M. D. V.; ODA, S. Come Hell or High Water: breeding the profile of eucalyptus tolerance to abiotic stress focusing water deficit. **Plant In Challenging Environments**, p. 91-127, 2021.

POUSTMA, M. L. Fundamental reactions of free radicals relevant of pyrolysis reactions. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, V. 54, p. 5-35, 2000.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D. > Pyrolysis-GC-MS Characterization of Forrage Materials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, p. 1426-1437, 1991.

RODRIGUES, B. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; DEMUNER, B. J.; MAFIA, R. G.; VIDAURRE, G. B. Chemical and Kraft Pulping Properties of Young Eucalypt Trees Affected by Physiological Disorders. **Forests**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 504, 24 mar. 2022.

SANTOS, R. C. **Parâmetros de qualidade da madeira e do carvão vegetal de clones de eucalipto**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; DOMINGUES, R. M. A.; OLIVEIRA, C. S. D. VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; PASCOAL NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D. Secondary metabolites from *Eucalyptus grandis* wood cultivated in Portugal, Brazil and South Africa, **Industrial Crops and Products**, V. 95, p.357-364, 2017.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, n. 42, v.4, p. 558-566, 2013.

SILVA, F. T. M. **Valorização da madeira *Eucalyptus* sp. via pirólise: caracterização e rendimentos dos produtos**. 2019. 152f. Tese (Doutorado Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

SILVA, H. K. P. **Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação em folhas de dois clones comerciais de eucalipto**. 2020. 153p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2020.

SILVA, S. R.; BAZANI, J. H.; VRECHI, A.; GENTIL, M. S.; ZAMPROGNO-FERREIRA, K. C.; ROSSE, L. N. Palestra no 'VI Workshop de Melhoramento e XVI Reunião Técnica Científica do Programa Temático de Silvicultura e Manejo - PTSM' (Botucatu - SP): **Distúrbios fisiológicos ocasionados pelo estresse hídrico em clones de eucalipto na Veracel: estudo de caso e hipóteses**. 2010.

SILVA, V. L. **Caracterização de ligninas de *Eucalyptus* spp. pela técnica de pirólise associada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas**. 68f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2006.

SILVEIRA JUNIOR, E. G.; PEREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; DAVID, G. F.; SIMIONATTO, E.; OLIVEIRA, L. C. S. Valorization of guava (*Psidium guajava* L.) seeds for levoglucosan production by fast pyrolysis. **Cellulose**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 71-79, 24 out. 2021.

SILVEIRA JUNIOR, E. G.; SILVEIRA, T. C.; PEREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; DAVID, G. F.; FERNANDES, S. A. Fast pyrolysis of elephant grass: intensification of levoglucosan yield and other value-added pyrolytic by-products. **Journal of the Energy Institute**, [S.L.], v. 101, p. 254-264, abr. 2022.

SOARES, V. C.; BIANCHI, M. L.; TRUGILHO, P. F.; PEREIRA, A. J.; HÖFLER, J. Correlações entre as propriedades da madeira e do carvão vegetal de híbridos de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.38, n.3, p. 543-549, 2014.

SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A. Metabólitos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 01 – 08, 2017.

TEAM, POSIT. **RStudio**: Integrated Development Environment for R. Versão: 2023.6.2.561. Boston, MA: Posit Software, 2023. Disponível em: <http://www.posit.co/>. Acesso em: 8 dez. 2023.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, p. 2-2, nov., 2020.

The jamovi project. **Jamovi**. 2022. (Version 2.3) [Computer Software]. Disponível em: <https://www.jamovi.org>.

VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist**, [S.L.], v. 176, n. 4, p. 749-763, 8 nov. 2007.

VELLOSO, M. A. L.; ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo in vitro. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 2, p. 267-272, 2009.

VIDAURRE, G. B.; SILVA, J. G. M.; MOULIN, J. C.; CARNEIRO, A. C. O. **Qualidade da madeira de eucalipto proveniente de plantações no Brasil**. Dados eletrônicos. Vitória: EDUFES, 2020. 221 p.

WAMPLER T. P. Introduction to pyrolysis-capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, V. 842, p. 207-220, 1999.

WAMPLER, T. P. **Applied Pyrolysis Handbook**. New York, Marcel Dekker, 1995, 361p.

YUAN, J.-M.; LI, H.; XIAO, L.-P.; WANG, T.-P.; REN, W.-F.; LU, Q.; SUN, R.-C. Valorization of lignin into phenolic compounds via fast pyrolysis: impact of lignin structure. **Fuel**, v. 319, p. 123758, jul., 2022

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051-1056, out. 2013.

ZHANG, M.; RESENDE, F. L. P.; MOUTSOGLOU, A.; RAYNIE, D. E. Pyrolysis of lignin extracted from prairie cordgrass, aspen, and Kraft lignin by Py-GC/MS and TGA/FTIR. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [S.L.], v. 98, p. 65-71, nov. 2012.

ZHANG, Y.; WANG, X. Geographical spatial distribution and productivity dynamic change of eucalyptus plantations in China. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, out., 2021.

ZHANG, Z.; SONG, J.; HAN, B. Catalytic Transformation of Lignocellulose into Chemicals and Fuel Products in Ionic Liquids. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 117, n. 10, p. 6834-6880, 28 nov. 2016.

ZHAO, Y.; ZHANG, H.; ZONG, P.; ZHOU, H.; TIAN, Y. Evaluation of pyrolysis characteristics and product distribution of black liquor using Py-GC/MS and down tube reactor: comparison with lignin. **Fuel**, v. 292, p. 120286, maio 2021.

CAPÍTULO II

ANÁLISE BROMATOLÓGICA DA CASCA E LENHO DE CLONES DIVERGENTES QUANTO A TOLERÂNCIA AO DISTÚRBO FISIOLÓGICO DO EUCALIPTO

RESUMO

As florestas plantadas de eucalipto são responsáveis por produtos desde a construção civil, produção de pasta de celulose, indústria química e outros, o que contribui para a importância do setor florestal no PIB brasileiro. Apesar de sua boa adaptação às condições de solo e clima no Brasil, a cultura do eucalipto encontra desafios como o distúrbio fisiológico que é associado a estresses abióticos. A sintomatologia do distúrbio envolve lesões, intumescimento e trincamento de casca e galhos, além de super brotação, abscisão foliar e até a morte da planta. A ausência de informações adicionais da casca, onde são observados alguns dos sintomas, associadas à tolerância ou a suscetibilidade dos clones de eucalipto nos levaram a condução deste experimento. Clones comerciais de eucalipto foram selecionados com base em sua resposta e ocorrência do distúrbio fisiológico em condições de campo. Um experimento de campo, realizado em delineamento de blocos casualizados compostos por 30 clones foi utilizado onde foram selecionados 9 genótipos com base nos fenótipos divergentes. Três árvores por clone foram amostradas ao longo do fuste nas posições do DAP (diâmetro à altura do peito), 50% e 75% da altura total. A classificação e dados históricos do comportamento dos clones e as notas de DFE atribuídas às árvores amostradas foram utilizadas como referência para comparação e avaliação das variáveis químicas. A concentração de carboidratos solúveis (totais, redutores e não redutores) e amido, fenólicos e aminoácidos totais e de ácido caféico, quercetina e ácido gálico foram determinadas em amostras de casca e lenho de clones divergentes quanto a tolerância ao DFE. As análises foram feitas a partir de amostras processadas para análise nutricional. As metodologias para quantificação dos compostos, enzimática e colorimétrica para os carboidratos, colorimétrica para fenólicos e aminoácidos totais, laboratoriais como o pH e condutividade elétrica e HPLC para os fenólicos, bem como a obtenção das amostras visaram a rapidez na obtenção dos dados. Algumas propriedades químicas da casca e lenho puderam ser associadas à tolerância ao distúrbio fisiológico do eucalipto. Correlações significativas da condutividade elétrica, pH, aminoácidos totais, fenólicos como ácido caféico, quercetina e ácido gálico mostram serem importantes na resposta das plantas aos gatilhos que favorecem o distúrbio. O pH da solução/filtrado de amostras da

casca e lenho proporcionaram diferenças significativas que podem contribuir para a diferenciação dos genótipos divergentes quanto a ocorrência do distúrbio.

Palavras chave: DFE. Composição química. Fenólicos. Melhoramento de plantas. Bromatologia.

CHAPTER II

BROMATOLOGICAL ANALYSIS OF BARK AND WOOD OF DIVERGENT CLONES TO THE TOLERANCE TO THE EUCALYPT PHYSIOLOGICAL DISORDER

ABSTRACT

Planted eucalyptus forests are responsible for various products ranging from civil construction, cellulose pulp production, chemical industry and others, which contributes to the importance of the forestry sector in the Brazilian GDP. Despite its good adaptation to soil and climate conditions in Brazil, eucalyptus cultivation faces challenges such as physiological disorders that are associated with abiotic stresses. The symptomatology of the disorder involves lesions, swelling and cracking of bark and branches, in addition to over sprouting, leaf abscission and even death of the plant. The lack of additional information from the bark, where some of the symptoms are observed, associated with the tolerance or susceptibility of the eucalyptus clones led us to conduct this experiment. Commercial eucalyptus clones were selected based on their response and occurrence of physiological disturbance under field conditions. A field experiment, carried out in a randomized block design consisting of 30 clones in a commercial plantation, was used where 9 genotypes were selected based on divergent phenotypes. Three trees per clone were sampled along the stem at the positions of DBH (diameter at breast height), 50% and 75% of the total height. The classification and historical data on the behavior of the clones and the EPD scores assigned to the sampled trees were used as a reference for comparison and evaluation of the chemical variables. The concentration of soluble carbohydrates (total, reducing and non-reducing) and starch, phenolics and total amino acids and caffeic acid, quercetin and gallic acid were determined in bark and wood samples from clones divergent in terms of tolerance to EPD. The analyzes were carried out using samples processed for nutritional analysis. The methodologies for quantifying the compounds, enzymatic and colorimetric for carbohydrates, colorimetric for phenolics and total amino acids, laboratory methods such as pH and electrical conductivity and HPLC for phenolics, as well as obtaining the samples aimed to quickly obtain data. It was found that there are chemical properties of the bark and wood that can be associated with tolerance to the physiological disorder of eucalyptus. Significant correlations of electrical conductivity, pH, total amino acids, phenolics such as caffeic acid, quercetin and gallic acid show that they are important in the

plants' response to triggers that favor the disorder. The pH of the solution/filtrate of bark and wood samples provided significant differences that may contribute to the differentiation of divergent genotypes regarding the occurrence of the disorder.

Keywords: EPD. Chemical composition. Phenolics. Plant breeding. Bromatology.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto é importante em diversos setores em nível mundial e nacional (FAO, 2023; IBA, 2023), onde a construção civil, eletricidade, alimentos e bebidas, são evidenciadas no cenário brasileiro (IBÁ, 2023). Produtos como a biomassa lignocelulósica de destacam em meio a aplicações mais recentes na produção de combustíveis e bioquímicos (YOGALAKSHMI et al., 2023). O setor florestal também apresenta potencial para reduzir impactos negativos ao ambiente (SEMBRIRING et al., 2020), novas tecnologias e produtos dentro de uma economia circular (ETC/CE, 2023). A contribuição do setor correspondeu a 6,3% do PIB brasileiro, equivalendo a 260 bilhões de reais e se destacando como maior exportador de celulose no mundo, com uma movimentação de 8,4 bilhões de dólares em 2022 (IBÁ, 2023). Neste mesmo ano no Brasil, tivemos em 9,94 milhões de hectares plantados, dos quais, 76% com eucalipto (IBÁ, 2023).

O consumo e o comércio de produtos de madeira serão afetados em vista as mudanças climáticas previstas que indicam aumento no período de secas e acréscimos na temperatura (IPCC, 2014; VIRTUOSO, 2018; FLORENCIO et al., 2022). Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico tem destaque (MUELLER-DOMBOIS, 1986; WHITE et al., 1998; CARNICER et al., 2011; PICOLI et al., 2021), devido o potencial de ocasionar o DFE (FENSHAM e HOLMAN, 1999; JURSKIS, 2005; CORRÊA et al., 2017; CAETANO-MADEIRA et al., 2023) e provocar perdas na produtividade (FRACASSO et al. 2016; TESHOME et al., 2020).

A sintomatologia externa do distúrbio fisiológico do eucalipto envolve lesões e descoloração, intumescimento e trincamento da casca e galhos, super brotação, bifurcação da haste principal, abscisão foliar e até a morte da planta (ALFENAS et al., 2009; ALMEIDA, et al., 2022). Adicionalmente, há efeitos negativos como menor desenvolvimento das plantas e de cerne (CÂMARA et al., 2020), redução da qualidade da madeira e rendimento de polpa (CÂMARA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2022) e aumento da quantidade de extrativos e lignina (RODRIGUES et al., 2022).

Considerando estas moléculas serem fidedignas ao fenótipo exibido pelo organismo e expressarem a união de fatores genéticos e ambientais (SILVA, 2020), o estudo dos metabólitos apresenta potencial de informações para melhor compreensão do distúrbio e seleção de clones. O estudo de materiais mais e menos suscetíveis ao distúrbio em condições de plantios comerciais proporcionou a identificação de características que puderam ser associadas a clones mais tolerantes (CORRÊA et al., 2017; ANDRADE-BUENO et al., 2020; ALMEIDA et al., 2022; CAETANO-MADEIRA et al., 2023).

Caetano-Madeira et al. (2023) observaram a ocorrência de ajustes estruturais, fisiológicos e metabólicos que são contrastantes nas respostas dos clones de eucalipto mais e menos tolerantes ao estresse. Os autores observaram uma redução em características de crescimento como o diâmetro do caule e matéria seca são observadas no material suscetível, enquanto há uma interação da quantidade de boro e cálcio e diferenças significativas metabólitos entre os materiais divergentes para a tolerância ao distúrbio.

DIAS et al. (2023) relataram o acúmulo de arginina, ácido gálico e caféico em clones tolerantes e redução de glicose, inositol e ácido shiquímico em clones suscetíveis de eucalipto conduzido sob estresse hídrico foi relatada como um aspecto diferencial do metabolismo destes genótipos que permitiu sua discriminação e melhor compreensão do fenótipo tolerante. De forma complementar, maiores teores de carboidratos não-estruturais foram associados a menor perda de biomassa de madeira e, portanto, potenciais indicadores de estresse em clones de eucalipto (PIZZI, 2016). Santos et al. (2017) verificaram que há variação e compostos fenólicos e do seu potencial antioxidante em amostras de eucalipto de acordo com sua procedência. A existência de mecanismos de resposta comuns ao déficit hídrico e distúrbio fisiológico (PICOLI et al., 2021; CAETANO-MADEIRA et al., 2023) corrobora para a ocorrência diferenciada de metabólitos na casca e lenho para a identificação de clones de eucalipto mais tolerante ao DFE.

A seleção em programas de melhoramento florestal prioriza as características de interesse, como volume de madeira, forma do tronco da árvore, qualidade da madeira para usos múltiplos e tolerância aos estresses abióticos (SOUZA, 2016). Idealmente, os biomarcadores devem ser confiáveis, reproduzíveis, informativos, de acesso fácil e rápido, além de refletir a capacidade das árvores responderem e se adaptarem aos estresses ambientais (PICOLI et al., 2021). Devido a especificidade de detecção HPLC (WALLIS e FOLEY 2005; MIRANDA et al., 2016; SANTOS et al., 2017) e praticidade para a detecção de carboidratos em amostras lenhosas por colorimetria (CHOW e LANDHÄUSSER 2004; RAZOUK et al., 2022) foram utilizadas nesta abordagem.

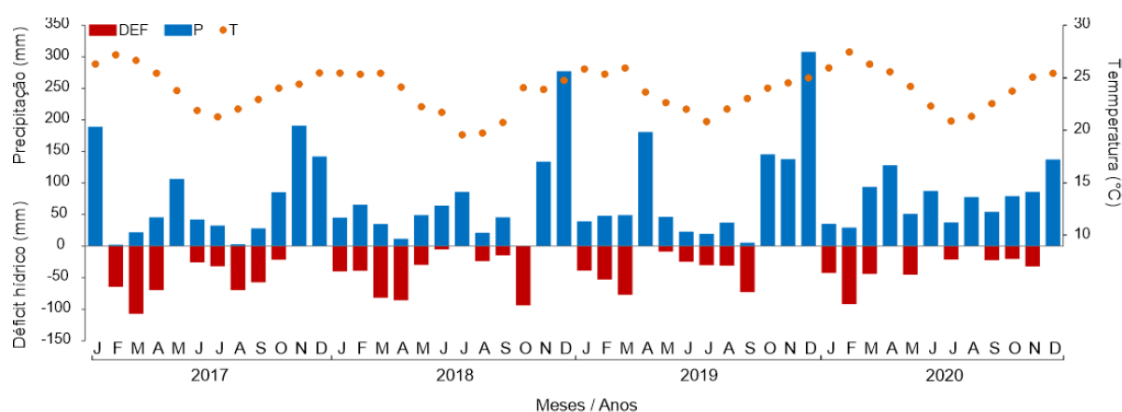
Este trabalho foi conduzido com o objetivo de associar compostos químicos, obtidos a partir de amostras de casca e lenho, e os associar ao fenótipo de tolerância ao distúrbio fisiológico do eucalipto (DFE). Adicionalmente, serão gerados dados complementares às respostas de clones de respostas divergentes a um conjunto de fatores ambientais favoráveis ao DFE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Local de condução

O plantio experimental avaliado foi conduzido no distrito de Itabatã, município de Mucuri no Sul da Bahia/BR entre 2015 a 2020, 5 anos. O local possui clima caracterizado como Aw (tropical com inverno seco) e apresentou, entre os anos de 2017 e 2020, temperatura média do ar de 24°C, precipitação de 915 mm ano⁻¹ e déficit hídrico de 380 mm ano⁻¹. Os dados mensais de precipitação (mm), temperatura (°C) e déficit hídrico (mm) ao longo de 4 anos de plantio são apresentados na Figura 1.

Figura 2 - Dados mensais de temperatura (°C), precipitação pluviométrica (mm) e déficit hídrico (mm), no período de 2017 a 2020 em Mucuri, Bahia, Brasil.



Fonte: ALMEIDA et al. (2022).

1.2 Coleta do material

A coleta do material é vinculada ao projeto de pesquisa “Descrição anatômica de folhas e caules de clones semicomerciais da Suzano S.A.” que tem o objetivo de caracterização e descrição da anatomia da folha, casca e lenho de amostras de clones de interesse da Suzano S/A, mantidos em áreas de plantios comerciais ou experimentais. A escolha da área foi baseada na proximidade da fábrica e por ser uma área com propósito comercial e experimental, com registro de ocorrência do DFE, utilizada para a avaliação de clones do programa de melhoramento da empresa (Figura 2A).

As coletas foram realizadas em parcelas de um experimento instalado em uma área de plantio experimental da Suzano S.A. que apresenta histórico de ocorrência do distúrbio. O delineamento experimental foi composto por 4 blocos para a avaliação de 30 clones, dos quais

foram selecionados nove genótipos (clones) de acordo com histórico de incidência do distúrbio nos *stands* comerciais variando de mais tolerante, intermediariamente tolerante e suscetível. Os critérios e classificação dos clones são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Três (3) dos 4 blocos originais foram amostrados, sendo o quarto bloco preservado de acordo com o planejamento do experimento pela empresa. Os blocos foram originalmente compostos por 6 plantas, a partir dos quais uma árvore viva e representativa de cada bloco foi derrubada para amostragem e avaliação em cada unidade experimental designada para a amostragem. Para efeito de coleta, árvores mortas foram desconsideradas. Os indivíduos escolhidos para a amostragem eram representativos (média) das demais plantas em cada parcela, em termos de crescimento e ocorrência do distúrbio.

Discos de aproximadamente 5 cm do caule de cada um dos nove clones de *Eucalyptus* spp. foram coletadas nas alturas do DAP, 50% e 75% da altura comercial (Figura 2B e 2C). No momento da coleta, as árvores foram classificadas quanto à severidade do distúrbio fisiológico nos indivíduos amostrados seguindo os critérios descritos na Tabela 1 e de acordo com seu registro histórico de ocorrência do distúrbio nos plantios comerciais da empresa. A Suzano S.A. forneceu os dados da estimativa de ocorrência do distúrbio nos clones em outras áreas de plantio comercial e a classificação do fenótipo dos clones adotada de acordo com o histórico de ocorrência de DFE nas demais áreas da empresa.

As amostras de cascas e lenhos secos foram mantidas em cômodo aberto com ventilação natural e sem incidência de luz solar direta. Após um período de em torno de 5 dias, as amostras foram separadas em cascas e lenho das árvores amostradas, sendo as amostras compostas constituídas pelo material de cada planta nas 3 alturas (DAP, 50% e 75% da altura comercial).

As amostras de casca e lenho foram moídas separadamente em moinho de facas, peneiradas em condições ambientes, protegidas da luz solar e até equilíbrio higroscópico. As amostras moídas foram fracionadas e peneiradas em sistema vibratório com peneiras padrão e a fração entre 40-60 mesh (0,425–0,250 mm) coletada para análise química nutricional. Parte das amostras foram reservadas, secas em estufa a 50-55 °C até peso constante e mantidas em recipientes fechados até a análise (Figura 2D). As demais análises nutricionais, crescimento e de anatomia da casca serão discutidos em outro momento.

1.3 Análise de parâmetros laboratoriais e químicos (colorimetria e enzimas)

Amostras compostas de casca e lenho de cada um dos clones foram analisados por colorimetria e reação enzimática para a quantificação de açúcares redutores, não redutores e

totais. A determinação de amido, fenólicos e aminoácidos totais foi realizada somente por análise de colorimetria.

Tabela 1 - Classificação dos clones de *Eucalyptus* em relação à severidade do distúrbio fisiológico baseado na observação de sintomas.

Nível	Sintomas
Nível 0	Plantas assintomáticas.
Nível 1	Lesão superficial deprimida, trincamento e ligeiro descolamento da casca (“escamação”), aleatoriamente distribuídos no tronco ou nos galhos.
Nível 2	Queima do terço basal da copa, trincamento da casca e intumescimento em pontos específicos do caule ou aleatoriamente distribuídos ao longo da haste principal ou dos ramos.
Nível 3	Seca de ponteiros, bifurcação do tronco principal, superbrotação, formação de casca corticosa e liberação de casca (periderme exofilática) e edemas (calosidade ou lixa) foliares.
Nível 4	Secamento da copa e morte da planta.

Fonte: ALMEIDA et al. (2022).

Tabela 2 – Relação das amostras, fenótipo e espécies dos clones comerciais e informações do histórico de ocorrência do DFE nos campos de plantio comercial da Suzano S.A.

Clone/amostra	fenótipo	espécie/cruzamento
1	tolerante	<i>E. urophylla</i>
2	tolerante	<i>E. urophylla</i>
3	tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
4	semi-tolerante	<i>E. grandis</i>
5	semi-tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
6	semi-tolerante	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>
7	mod-suscetível	<i>E. grandis</i>
8	Suscetível	<i>E. urophylla</i>
9	suscetível	<i>E. grandis</i>

Figura 1 – Visão geral do plantio e amostras das cascas e caules de eucalipto. A) visão geral da área de plantio da empresa onde foi conduzido o experimento; B) posições na planta derrubada onde se coletaram as amostras – DAP, 50% e 75% da altura comercial das árvores, que compuseram a amostra composta para as análises; C) detalhe de uma amostra árvore derrubada e medição para determinar os pontos de coleta; D) delimitação da casca e xilema a serem avaliados; E) Amostras da casca (CA12) e lenho (LA23).



Carboidratos solúveis (colorimetria e método enzimático)

Para a quantificação de carboidratos não redutores (DUBOIS et al., 1956), foi pesado 1 g de material vegetal, fervido com etanol a 80% a 70°C por 30 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 min a 2000 rpm e, assim, o processo foi repetido três vezes. Após a repetição, as amostras foram armazenadas em um congelador a 4°C. Em seguida, as amostras foram adicionadas em uma solução de ácido fenólico a 5% com ácido sulfúrico concentrado e deixadas em banho-maria a 30°C por 20 min antes de serem analisadas em um espectrofotômetro a 490 nm.

Na quantificação de carboidratos redutores (GONÇALVES et al., 2010 - Método DNS Adaptado), foi preparada uma solução de frutose a 0,2% e 5 g de ácido DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 98%), que foi misturada com 250 ml de água destilada a 80°C. A solução foi misturada com 100 ml de NaOH (2N). Após a mistura, foram adicionados 150 g de tartarato de

sódio e potássio 4-hidratado. O ensaio foi realizado com a mistura de 500 ug de casca ou madeira e 500 ul de DNS, agitados e fervidos por 5 min em banho-maria, resfriados em gelo e adicionados a 4 ml de água destilada. Após a execução desses processos, o substrato foi analisado em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, EUA) a 540 nm. Os valores de açúcares foram expressos em mg g^{-1} , enquanto os valores de amido, fenólicos e aminoácidos totais foram expressos em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$.

Os carboidratos totais e redutores foi realizado com kits de detecção de glicose (Glucose and sucrose Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit, Sigma-Aldrich) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de açúcares estimada por colorimetria foi expressa em $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$ e a concentração de açúcares estimada por reação enzimática em $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$.

Quantificação de amido

O método descrito por McCready et al. (1950) foi adotado para a quantificação do amido. A partir do resíduo obtido da extração de açúcares totais, foram adicionados ao material seco 2,5 mL de água desionizada e 3,5 mL de ácido perclórico 52%, em tubos de centrífuga. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso por 30 min. O sobrenadante obtido após centrifugação a 2000g foi recolhido em provetas de 25 mL. Essa etapa foi repetida 3 vezes, completando-se o volume das provetas para 25 mL com água desionizada. A quantificação de amido foi feita da mesma maneira que a quantificação de açúcares solúveis totais, de acordo com Dubois et al. (1956), sendo o resultado multiplicado pelo fator de correção 0,9 e expressa em % amido. A concentração de amido foi expressa em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$.

Fenólicos solúveis totais

Um grama de amostra foi tratado com metanol 100% (10 mL) em banho ultrassônico por 30 min. Os extratos foram filtrados em Whatman nº 1 e concentrados até a secura. O conteúdo fenólico total (CPT) foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A determinação de fenólicos totais foram avaliados pelo método de Fu et al. (2010) com modificações. Cerca 30 μL da amostra foi adicionada de 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu 10% (v/v) por 10 min em condições ambiente sem luminosidade. Em seguida 80 μL de Na_2CO_3 (7,5%) foi adicionado ao meio reacional e deixado em repouso por 30 min a temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 760 nm e a concentração estimada a partir do padrão ácido gálico em $\text{mg EAG } 100\text{g}^{-1}$. A concentração de fenólicos totais foi expressa em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$.

Aminoácidos totais

A concentração de aminoácidos totais foi determinada de acordo com a metodologia de Moore e Stain (1948). O extrato etanólico foi incubado em um meio contendo tampão citrato (1M + 0,2 % de ácido cítrico) e ninidrina 1% (p/v) por 20 min a 95 °C. A absorbância foi lida

em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, EUA) a 570 nm e a concentração estimada com base na curva de calibração com glicina. Os aminoácidos totais foram expressos em mmol kg^{-1} .

Aferição de pH e condutividade elétrica

Em relação à quantificação do pH e condutividade elétrica, as amostras foram pesadas em 0,1 g de material vegetal e deixadas em repouso em água destilada durante a noite. Em seguida, as amostras foram aferidas em um medidor de pH e um equipamento de condutividade elétrica (Digimed, modelo DM-31) e os resultados foram anotados em uma planilha. Os dados de condutividade elétrica foram expressos em $\mu\text{S/cm}$. As medidas foram realizadas uma ou duas vezes para efeito de aferição ou até obtenção de valores de leitura constantes.

1.4 Análise de HPLC

As amostras foram pesadas e 100 mg de biomassa foi moída/triturada em um microtubo de 2 mL. Um volume de mL da solução de extração (metanol:isopropanol: ácido acético (20:79:1)) foi adicionada ao microtubo. O conteúdo dos recipientes foi agitado com 2 esferas metálicas por 5 min no Tissuelyser (Qiagen), com a frequência de 30 agitações seg^{-1} . Essa etapa foi repetida por 3 vezes e as amostras mantidas em gelo em um intervalo de 5 min. As amostras foram centrifugadas por 2 vezes (14 000 x g, 10 min, 4 C). Os Sobrenadantes foram coletados e filtrados em membranas de 0.22 μm . As amostras foram armazenadas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da aplicação.

As concentrações dos compostos fenólicos foram determinados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Cromatógrafo LC-20A Prominence Shimadzu, Japão) equipado com SPD-20A, com comprimento de onda a 325 nm e coluna Kinetex C18 100 A (250 x 4,6 mm, Torrance, Califórnia, USA). A eluição foi feita em gradiente, como fases móveis tivemos ácido acético 0.1 % em água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (fase B). O fluxo de foi de 1 mL min^{-1} .

O início com 5 % do agente carreador (fase B) ocorreu, até 3 minutos, de 3- 15 min ocorreu uma rampa até 15 % de B, de 15-35 min foi até 50 % de B, 36 min 95 % de B até 40 min e ao 40, 5 % de B, mantendo até 42 min. Foram injetados 10 μL de cada amostra.

Os fenólicos identificados foram confirmados comparando seu tempo de retenção, espectro e adição da solução padrão ao extrato. A quantificação de fenólicos por HPLC-UV foi obtida pelas curvas de calibração com injeção de soluções padrão de ácidos caféico, ácido gálico e quercetina. A concentração de quercetina, ácido caféico e ácido gálico foram expressas em mg mL^{-1} .

2.5. Análise histoquímica – histolocalização do amido

As amostras de casca, fixadas e mantidas em solução de etanol 70%, foram subamostradas em seções retangulares de lado médio de 4-8 mm. As amostras consistiram de casca, câmbio e um pequeno fragmento de tecido secundário do xilema. As amostras foram desidratadas em série etílica graduada crescente e incluídas em metacrilato (Historesin – Leica) de acordo com as recomendações do fabricante, com adaptações. O período de embebição foi estendido para 8 semanas e a historesina renovada três vezes. Durante esse processo, as amostras foram submetidas ao vácuo e mantidas a 8°C .

As mostras foram emblocadas e seccionadas em micrótomo rotativo (RM2265 – Leica). Os cortes foram corados com azul de toluidina (O’Brien et al, 1964) e montados em lâminas de vidro com resina sintética (Permount). As análises histoquímicas foram realizadas com reagente de Lugol (Johansen, 1940) e reação periódica ácido-Schiff (PAS) (McManus, 1948) para detecção de amido. As análises com azul de toluidina e Lugol foram utilizadas como referencial de localização do amido nos tecidos. As imagens foram obtidas e observadas em fotomicroscópio (AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-PHOTO conectado a uma câmara digital (AxionCam Carl Zeiss, Gena, Alemanha).

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e ao teste de homogeneidade de Levene. Posteriormente, realizou-se à análise de variância e, quando verificados efeitos significativos, foram realizados testes de Tukey ($p < 0,05$) para comparar as médias dos tratamentos. A análise de correlação de Pearson foi realizada para todas as variáveis, dados das notas de avaliação dos clones e genótipo (espécie ou híbrido) dos clones avaliados. Utilizou-se o programa RStudio® (Team, 2023) para as análises estatísticas.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

As variáveis bromatológicas amido total na casca (SB), condutividade elétrica da solução de amostra do lenho (ECW), açúcares redutores da casca por colorimetria (RSBC) e enzima (RSBE), açúcares totais na casca por colorimetria (TSBC) e enzima (TSBE), açúcares não-redutores na casca por enzima (NSBE), açúcares redutores do lenho por enzima (RSWE) e açúcares totais do lenho por colorimetria (TSWC) não apresentaram diferença significativa entre os genótipos testados (Apêndice, Tabela 3). Estas variáveis foram suprimidas dos gráficos, sendo apresentada somente a ANOVA (Apêndice, Tabela 3).

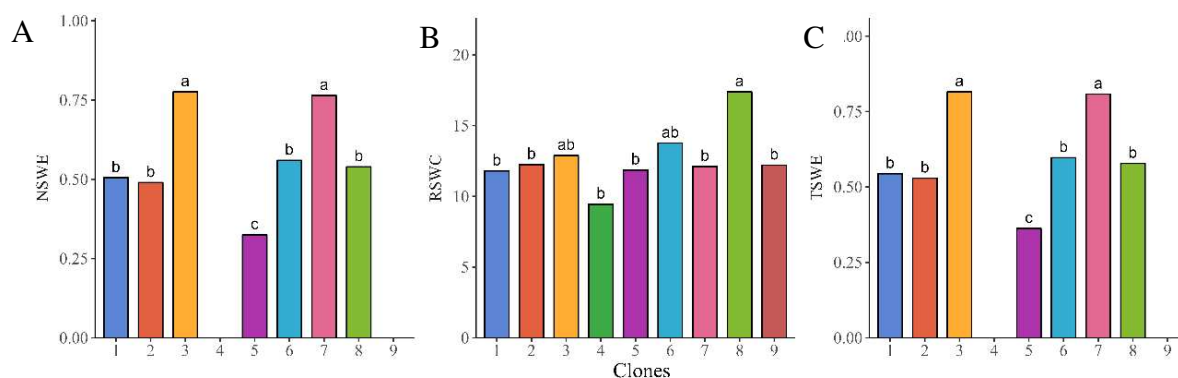
As variáveis açúcares totais no lenho por enzima (TSWE), açúcares não-redutores no lenho por enzima (NSWE) e açúcares redutores do lenho por colorimetria (RSWC) apresentaram diferenças significativas (Figura 3), entretanto, falharam na pressuposição de distribuição normal. Considerando a impossibilidade da discriminação dos genótipos tolerantes dos suscetíveis com base nestas variáveis, optou-se por descartá-las para fim do estudo das eventuais relações com a tolerância ao DFE, com base nos testes de média. A análise de HPLC para a detecção de carboidratos solúveis foi realizada, mas sem sucesso na detecção destes compostos (dados não apresentados). A forma com que as amostras foram processadas, secas à temperatura ambiente parece ter contribuído para o consumo dos carboidratos nas amostras durante o armazenamento. A diferença de temperatura na condução das plantas mostrou ser capaz de reduzir a concentrações de açúcares solúveis em amostras foliares (MOKOCHINSKI et al., 2018). Estas observações nos levaram a optar pelo pelo descarte destas variáveis para os testes de médias. Dado a expectativa dos tecidos de amostras de casca e lenho estarem vivos por um tempo indefinido e após a coleta, não há como excluir a possibilidade de que a concentração de açúcares possa ter sido influenciada pelo processamento de secagem a temperatura ambiente.

Em condições severas, os principais compostos a sofrem mudanças no seu padrão de distribuição são os carboidratos (HARTMANN; TRUMBORE, 2016; MOKOCHINSKI et al., 2018). Mendes (2015) avaliou a fenotipagem para estudos de tolerância a estresse abiótico com foco no déficit hídrico em mudas de 3 híbridos de eucalipto, observou que não houve diferenças nos teores de açúcares redutores (AR) entre os híbridos. Mokochinski et al. (2018) relataram alterações nas vias bioquímica sendo o metabolismo dos açúcares mais afetado em amostras foliares de espécies de *Eucalyptus*, com significativa redução de frutose e glicose com o aumento da temperatura no qual as plantas foram mantidas. Os autores ressaltam que o estresse ambiental, como temperaturas extremas, pode afetar significativamente o metabolismo das

plantas de eucalipto, resultando em mudanças na abundância relativa de metabólitos primários e secundários. Isto é coerente com a falta de detecção de açúcares solúveis por HPLC nas amostras de casca e lenho, bem como pode justificar a menor consistência, falha nas pressuposições de distribuição normal e homogeneidade dos dados de concentração de açúcares observados por colorimetria (dados não apresentados/Apêndice).

A forma de processamento das amostras é um fator a ser considerado juntamente à escolha de quais metabólitos serão utilizados nas avaliações. Caetano-Madeira et al. (2023) e Mokochinski et al. (2018) processaram as amostras foliares as congelando imediatamente em nitrogênio líquido sendo armazenadas 80°C, enquanto as amostras foliares de outros trabalhos (DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023) foram secas em estufa a 55°C. Ainda assim, foi possível detectar diferenças significativas, de diferentes compostos, entre as amostras foliares de eucalipto utilizadas nestes trabalhos e que foram relacionadas com sucesso com genótipos divergentes quanto ao déficit hídrico e ao DFE. Como nosso objetivo foi a obtenção de informações de forma mais rápida, a escolha por um processamento mais simples, como a secagem ao ar, seguindo o processamento adotado para as análises nutricionais (dados não apresentados) foi priorizado.

Figura 3 - Relação da concentração estimados por colorimetria, com a espessura de casca e lenho para clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE. NSW: açúcares não redutores lenho enzima (A); RSWC: açúcares redutores lenho enzima (B); TSWE: açúcares totais lenho enzima (C) em mg mL^{-1} . Clones: 1 a 3: tolerantes; 4 a 6: moderadamente tolerante; 7 a 9 suscetível. Clones seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



As demais variáveis apresentaram e distribuição normal e homogeneidade de variâncias seguindo com a ANOVA e a observação de diferenças significativas entre os clones avaliados (Apêndice Tabela 3, Figura 4). A concentração de aminoácidos na casca (Figura 4A), aminoácidos no lenho (Figura 4B), condutividade elétrica da solução de amostras da casca (Figura 4C), fenólicos totais na casca (Figura 4D) e amido total presente nas amostras do lenho (Figura 4H) não permitiram a discriminação dos genótipos tolerantes dos suscetíveis ao DFE com base no teste de médias. Apesar de sua concentração total de aminoácidos não diferenciar os clones tolerantes dos suscetíveis, verifica-se diferenças significativas entre os clones (Figura 4A e 4B). Aminoácidos específicos podem ter papel diferenciado em relação a tolerância a estresses abióticos. A prolina, por exemplo, está envolvida na proteção contra danos oxidativos e no ajuste osmótico, contribuindo para a sobrevivência das plantas em condições adversas, capaz de mitigar os impactos da seca, do sal e do estresse térmico nas plantas, desempenhando um papel multifacetado nas respostas aos estresses (GHAHREMANI et al., 2014).

No solo por outro lado, a condutividade elétrica alta pode ser relacionada a redução do potencial osmótico, requerendo um maior gasto de energia para absorver água e nutrientes (PEDROTTI et al., 2015). Nessas condições, a dispersão de íons cátions nas soluções promovem alterações na condutividade elétrica da água, podendo ocasionar distúrbios fisiológicos nas plantas e conseqüentemente podendo ocasionar estresse (OLIVEIRA, 2018).

Outras estratégias visando minimizar os efeitos adversos das condições de estresse abiótico estão ligadas ao metabolismo de aminoácidos (HILDEBRANDT, 2018), como no ajuste osmótico atuando como eliminadores de espécies reativas de oxigênio (BATISTA-SILVA et al., 2019). Segundo Vital (2019) e Chan (2021), o teor de aminoácidos e a condutividade elétrica ajudam na compreensão das mudanças fisiológicas e representam estratégias adaptativas importantes na tolerância das plantas a estresses abióticos, o que auxiliam como indicadores promissores para os programas de melhoramentos.

Diante da complexidade da resposta das plantas aos diferentes fatores que podem contribuir para a ocorrência do DFE, vale apontar uma tendência de menores valores de ECB e maiores valores de PB, PW e SW poderem ser relacionados aos clones tolerantes. Esta variável pode também ser relacionada a osmoregulação dos tecidos. Alguns trabalhos (ADAMS et al., 2005; ARNDT et al., 2008; ABID et al., 2009) relatam a presença de osmólitos relacionada a tolerância ao estresse salino e déficit hídrico em eucalipto. Uma maior estabilidade de membranas (WHITLOW et al., 1992; DEMIDCHIK et al., 2014; GUROVA e DENISYUK, 2021) nos tecidos dos clones tolerantes é uma explicação para os menores valores de

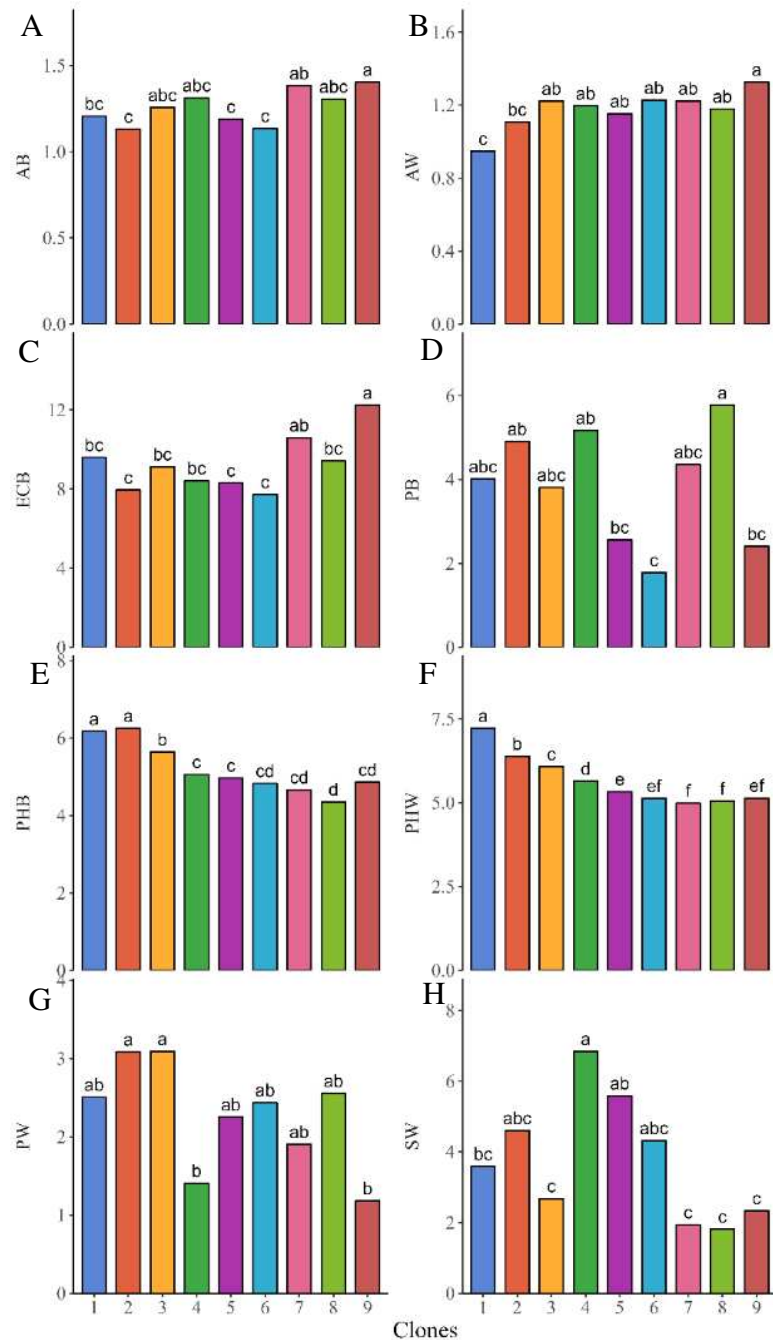
condutividade elétrica observados nos clones tolerantes em nosso trabalho, ainda que mais observações sejam necessárias.

Os valores de pH da solução das amostras da casca e do lenho apresentaram diferenças significativas e que foram capazes de separar nitidamente os clones tolerantes e suscetíveis (Figuras 4E e 4F). Os clones parcialmente tolerantes apresentaram valores intermediários. Minini et al. (2017) avaliando o resíduo de madeira de eucalipto, verificou nas amostras de casca o valor médio variando entre 4,27 e 4,96. Granda et al. (2011) avaliando as respostas rápidas do clone C14 de *Eucalyptus globulus* ao estresse hídrico, relataram que além do pH ser um dos primeiros a sofrer mudanças, ele ainda relata que o pH tendem a aumentar em situações de privação hídrica. Além disso, valores de pH mais elevado são encontrados na madeira em relação à casca devido ao seu maior teor inorgânico (ROWELL et al., 2005). Este comportamento foi relacionado a maior atividade cambial e da presença de extrativos (MININI et al., 2017), ainda que a maioria das espécies florestais, como na casca, apresentam pH ligeiramente ácido (IWAKIRI, 2005).

Apenas o pH da solução/filtrado das amostras de casca e lenho, dentre as demais variáveis analisadas nos testes de média foi suficiente para a identificação dos clones de acordo com seu fenótipo em relação ao DFE. Visando uma melhor contextualização das variáveis que apresentaram diferença significativa, sem a separação dos clones divergentes, uma análise de correlação entre todas as variáveis foi realizada.

O teor de amido no lenho (SW) variou entre 1,18 e 6,18 mg ml⁻¹ (Figura 4H). À exceção do clone 3, os demais clones tolerantes apresentaram valores maiores do que os suscetíveis. Apesar de apenas os clones 4 e 5 apresentarem diferença significativa em relação aos clones suscetíveis (7, 8 e 9), esta é uma tendência a ser considerada haja visto que as notas de intensidade de DFE variaram mesmo dentro dos clones tolerantes e semi-tolerantes (Tabela de correlação DFE, Figuras 3 e 4 do capítulo 1). Mokochinski et al. (2018) observaram a queda da concentração de glicose e frutose, concomitante ao aumento da sacarose, em tecidos foliares de eucalipto submetidos à períodos de exposição a temperaturas de 10° a 30°C. Os autores mencionaram que as alterações nos metabólitos primários indicaram que a via bioquímica mais influenciada pela temperatura estava relacionada ao metabolismo do açúcar e do amido. Aparentemente, os clones mais suscetíveis ou com ocorrência do distúrbio tiveram menor capacidade para formação de amido nos tecidos do xilema e floema em comparação aos clones de eucalipto mais tolerantes.

Figura 4 - Relação da concentração estimados por colorimetria, com a espessura de casca e lenho para clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE. AB: aminoácidos cascas em mmol kg^{-1} (A); AW: aminoácidos lenho em mmol kg^{-1} (B); ECB: condutividade elétrica casca em $\mu\text{S/cm}$ (C); PB: fenólicos na casca em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ (D); PHB: pH casca (E); PHW: pH lenho (F); PW: fenólicos do lenho $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ (G); SW: amido lenho $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ (H). Clones: 1 a 3: tolerantes; 4 a 6: moderadamente tolerante; 7 a 9 suscetível. Clones seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

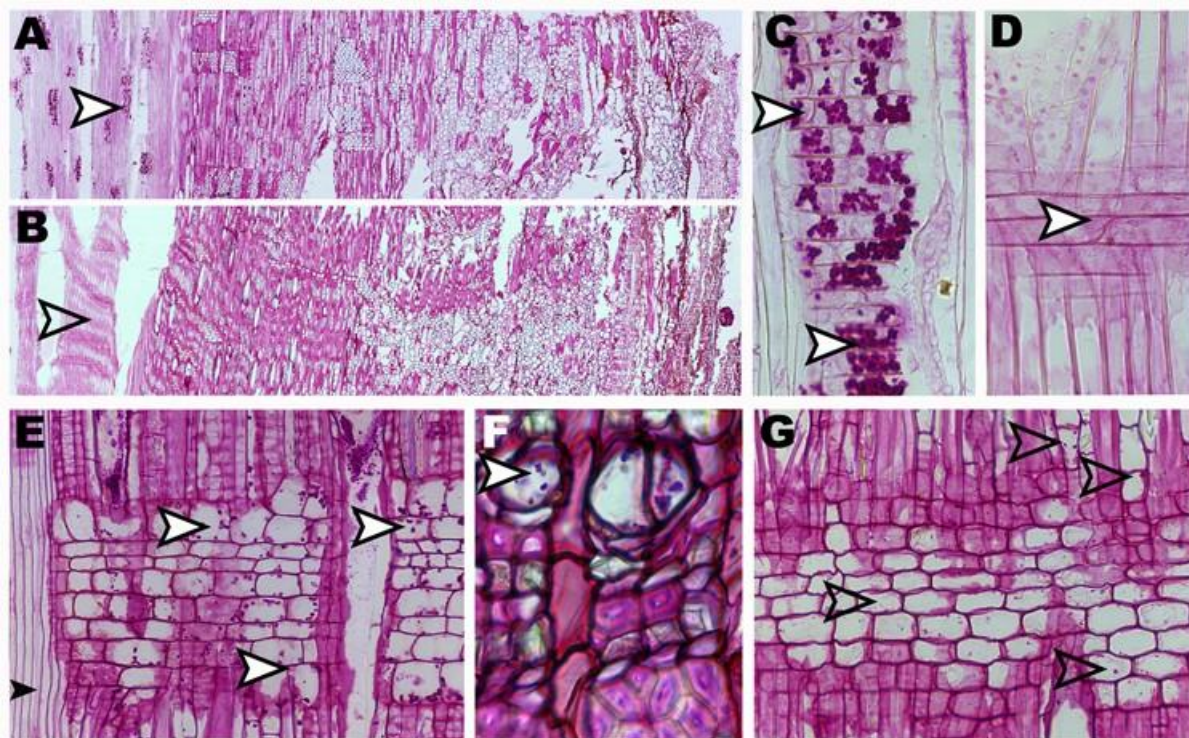


A variação da ocorrência e intensidade do DFE nas plantas amostradas pode ser associada a diferença na concentração do amido nas amostras que devem refletir a condição da árvore amostrada em relação ao distúrbio. Do mesmo modo, o nível de estresse sofrido pela planta pode ser refletido na concentração dos açúcares observados nas amostras. Schneider (2018) analisando os aspectos morfológicos e bioquímicos na tolerância ao frio em espécies de *Eucalyptus* spp., observou que independentes da época avaliada ou espécie analisada, a concentração de amido mostrou-se decrescente. Assim, o metabolismo do amido sob condições adversas, quando a fotossíntese é potencialmente limitada, o amido é remobilizado de diferentes tecidos para sustentar o crescimento, sendo necessários para a sustentação do metabolismo essencial, incluindo osmorregulação, transporte e sinalização (HARTMANN e TRUMBORE, 2016; DASGUPTA et al., 2020).

A disposição do amido nos tecidos do xilema e da casca é característico (Figura 5) e reflete a diferença entre os valores observados e uma associação com a ocorrência do DFE. Grãos de amido são encontrados no raio do xilema (Figura 5 C e 5D) e do floema (Figura 5E, 5F e 5G), ainda que os do raio xilemático sejam maiores (Figura 5C, 5D, 5E e 5G). A presença de amido no parênquima radial, a diferença de tamanho dos grãos de amido e da correlação com os clones tolerantes, pode refletir um papel de reserva de carboidratos ou respostas metabólicas destes clones em relação a uma condição de estresse. Estas diferenças também tem potencial contribuição para a diferenciação dos clones, sendo presente no tolerante e ausente ou menos disponível nos clones suscetíveis ou que apresentam DFE. Apesar da detecção histológica do amido ter objetivado a caracterização das células que apresentam o composto nos tecidos do xilema e floema, também evidencia aspectos úteis a compreensão do metabolismo. As células parenquimáticas do sistema axial e radial são vivas, mas apenas as células dos raios apresentaram amido. Há uma diferença na quantidade e tamanho dos grãos de amido encontrados no floema e xilema o que dá suporte a hipótese de que as plantas que sofrem o distúrbio têm comprometido o metabolismo de reservas de carboidratos na forma de amido.

A contribuição dos metabólitos avaliados pode beneficiada em uma avaliação detalhada de componentes isolados (CAETANO-MADEIRA et al., 2023; DIAS et al., 2017, DIAS et al., 2023) como parte de estratégias das plantas em resposta a condições de estresse. Fenólicos específicos podem ser associados à tolerância ao DFE (CAETANO-MADEIRA et al., 2023) e déficit hídrico (DIAS et al., 2017, DIAS et al., 2023), bem o acúmulo de osmólitos à tolerância ao déficit hídrico (PICOLI et al., 2021). Esta observação está de acordo com a complexidade da característica (MUELLER-DOMBOIS, 1986; CUNNINGHAM et al., 1999; CARNICER et al., 2011) e penetrância e expressividade incompleta da tolerância ao DFE (capítulo anterior).

Figura 5 – Histoquímica de tecidos da casca e xilema evidenciando a presença de amido. A e B, cortes radiais do xilema ao floema evidenciando células do raio com e sem amido; C e D, cortes do xilema evidenciando células do raio com e sem amido; E e G – cortes longitudinais do floema evidenciando a presença de amido e, F corte transversal do floema evidenciando amido dentro dos elementos de tubo crivado. A, C, E e F – clone tolerante ao DFE e, B, D e G – clone suscetível ao DFE.



Os resultados de Mokochinski et al. (2018) indicam que os compostos fenólicos foram alguns dos metabólitos mais afetados pelas mudanças de temperatura em todas as três espécies de eucalipto submetidas a diferentes regimes de temperatura. Os autores enfatizam que os compostos fenólicos desempenham um papel importante na resposta das plantas de eucalipto ao estresse térmico e sua regulação pode ser crucial para a adaptação das plantas a diferentes condições ambientais. Miranda (2021) analisado quantificação de compostos fenólicos em diferentes compartimentos arbóreos de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, relatou que a casca apresentou média maiores (4,43) do que o lenho (0,55). Neste estudo, a autora enfatiza as cascas possuem função de proteção das plantas, justificando o teor de fenóis encontrado estar associado ação contra agentes antipatogênicos e poder auxiliar as plantas em situações de estresses bióticos e abióticos.

As concentrações de ácido caféico no lenho foi retirado da ANOVA por não apresentar variação. O ácido gálico na casca (GAB), ácido caféico na casca (CAB) e ácido gálico no lenho (GAW) diferenciaram os clones, mas apenas GAW diferenciou os genótipos com base no teste

de médias (Tabela 4). As concentrações de ácido gálico e quercetina (Figura 6) apresentaram diferenças significativas entre os clones, mas a distinção entre os fenótipos tolerante e suscetível ao DFE não ficou clara.

Considerando terem sido avaliados *E. grandis*, *E. urophylla* e híbridos destas duas espécies, existem diferenças na concentração ácido gálico herdada de forma associada a contribuição das espécies como parentais. Santos et al. (2017) relata diferenças na proporção de fenólicos em amostras de *E. grandis* que apresentaram diferença significativa entre plantas cultivadas no Brasil e na África. Dias et al. (2017 e 2023) evidenciaram a importância de fenólicos específicos, como o ácido gálico, ácido caféico e quercetina, extraídos a partir de amostras foliares, na discriminação de clones de eucaliptos mais e menos tolerantes ao estresse hídrico. A diferença de compostos, o tipo de amostra e a influência da espécie e procedência das plantas pode ser fator a contribuir para resposta das árvores ou para a divergência entre os dados. Ainda assim, padronizadas as condições experimentais e de coleta das amostras, a quantificação de compostos químicos tem validade serem a expressão conjunta de fatores genéticos e ambientais, o que os habilita figurarem como biomarcadores para condições de estresse.

Santos et al. (2013) estudando a identificação de compostos fenólicos na madeira de eucalipto (*E. grandis*, *E. urograndis* e *E. maidenii*.) e Santos et al. (2012) analisando os compostos fenólicos na casca nas mesmas espécies, os autores observaram que para o ácido gálico foram verificadas maiores concentrações desse fenólico na casca nas três espécies avaliadas em comparação com a madeira. Corroborando com os resultados observados neste estudo relacionado a tolerância ao DFE, com maiores conteúdo do ácido gálico na casca do que na madeira. Estes resultados foram atribuídos à maior atividade cambial e da presença de extrativos, da qual o ácido gálico faz parte e ser encontrado em maiores concentrações na casca (MININI et al., 2017).

Existem correlações significativas de 5 a 0,1%, variando de baixas a altas entre as variáveis avaliadas e as espécies e clones (SPE) avaliados e as notas atribuídas ao clone de acordo com o histórico de ocorrência de DFE nos plantios comerciais (FDE) e as notas atribuídas às plantas avaliadas (FDO) (Figura 7). Apesar disso, serão discutidas apenas as correlações médias ou altas (iguais ou superiores a 50%). Como FDP e FDO apresentaram uma alta correlação e refletem as notas do distúrbio em eucalipto, apenas DFO foi considerada na análise de correlação.

Os valores de 100% para as correlações entre NSBE e TSBE; TSWE e NSWE foram atribuídos a forma de se calcular os açúcares não redutores por diferença entre os açúcares totais

e redutores. A alta correlação entre FDP e FDE indica que a forma de apresentação das notas relacionado aos valores históricos é adequada em ambas as formas refletindo a mesma informação. Por outro lado, correlações altas entre 60 e 67% foram observadas entre o fenótipo avaliado de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial, novamente, corrobora para a existência de outros fatores que terão influência na ocorrência dos sintomas do distúrbio. O mesmo resultado está de acordo com a penetrância e expressividade parciais para a característica tolerância ao DFE.

As correlações entre aminoácidos (AB) e pH (PHB) na casca e aminoácidos (AW) e condutividade elétrica (ECW) no lenho foram não significativas, enquanto foi positiva para aminoácidos (AB) e condutividade elétrica (ECB) na casca e negativa para aminoácidos (AW) e pH (PHW) no lenho, ambas significativas a 0,1%. Estas relações indicam um papel e expressão destes compostos diferenciados nestes tecidos e variáveis, respectivamente.

As concentrações de ácido caféico e ácido gálico no lenho são quase nulas e podem ser desprezadas (dados não apresentados), ainda que as correlações com fenólicos (PW) com açúcares no lenho (TSWC e RSWC) sejam positivas e significante a 0,1%. A concentração de fenólicos específicos na casca, como ácido caféico (CAB) tem um efeito negativo na concentração de açúcares no lenho (TSWE e NSWE) negativa, haja vistas as correlações significativas a 1%. A quercetina no lenho (QEW não apresentou diferença significativa (P-value=0,103, <0,05) e por isso foi desconsiderada nas análises. O ácido caféico no lenho (CAW) teve variação nula, por isto também excluído das análises.

Apesar de quercetina ser encontrada tanto na casca quanto no lenho (Figura 7) as correlações deste composto no lenho foram não significativas enquanto a concentração de fenólicos na casca (PB) com quercetina (QEB) e ácido gálico (GAB) foram positivas e significativas a 1% de probabilidade (Figura 7). A concentração de ácido gálico (GAB), quercetina (QEB) e açúcares redutores (RSBC) com fenólicos na casca (PB) também foram positivas e significativas a 1% ou menos. Estas relações mostram que a presença destes compostos fenólicos na casca tem um papel importante, comparativamente ao lenho. Adicionalmente, mostram ter influência em potencial na concentração ou disponibilidade destes compostos ou responderem aos mesmos fatores que controlam a concentração de componentes importantes no metabolismo das plantas como açúcares redutores. Esta importância dos fenólicos e ou da casca é também verificada ao observarmos uma correlação positiva e significativa do ácido caféico na casca (CAB) e amido encontrado no lenho no lenho (SW) (Figura 6). Estes resultados dão suporte à associação da concentração de fenólicos contribuir

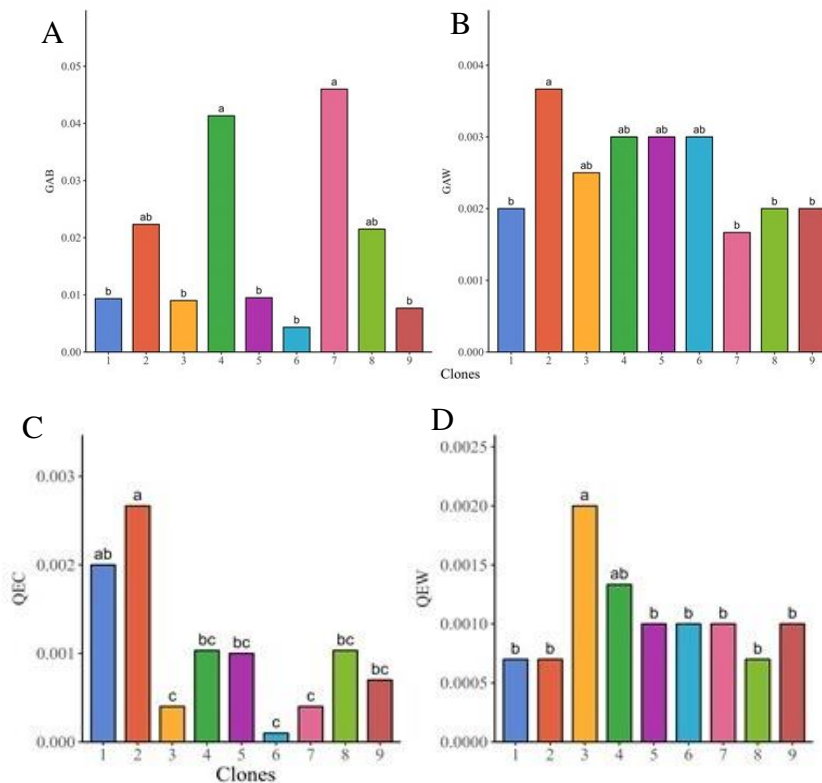
para a tolerância e ser utilizada como biomarcador para a seleção de genótipos (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013, DIAS et al., 2017; DIAS et al., 2023).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para as concentrações (GAB) ácido gálico da casca; (QEB) quercetina da casca; (CAB) ácido caféico da casca; (GAW) ácido gálico do lenho e (QEW) quercetina do lenho para clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE.

FV	GL	F				
		GAB	QEB	CAB	GAW	QEW
Genótipo	8	3,60*	1,84 ^{ns}	23,43*	3,04*	2,16 ^{ns}
Bloco	2	1,75 ^{ns}	0,18 ^{ns}	1,61 ^{ns}	1,01*	2,16 ^{ns}
CV (%)		73,80	44,44	29,26	25,37	33,62

^{ns} não significativo, * significativo a 5%, ** significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, CV: coeficiente de variação.

Figura 6 – Relação da concentração de fenólicos na casca e lenho (ACG – ácido gálico, casca; QEC – quercetina, casca e; QEW – quercetina, lenho) para clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE. Médias das concentrações (mg ml⁻¹) de ácido gálico, quercetina e ácido caféico quantificados por HPLC em amostras de casca (C1 a C9) e lenho (L1 a L9) de clones comerciais de eucalipto divergentes quanto a ocorrência de DFE. Clones seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Clones: 1 a 3: tolerantes; 4 a 6: moderadamente tolerante; 7 a 9 suscetível.



A concentração de fenólicos em particular, como o ácido gálico, está relacionado com a espécie de eucalipto (SPE) que participa do pedigree dos clones. Como valores arbitrários foram atribuídos a *E. grandis* e *E. urophylla*, e um valor intermediário ao híbrido e ter sido identificada correlação significativa a 0,1% (Figura 7), observamos que o híbrido é o grupo dentre os genótipos que apresenta menor concentração de ácido gálico na casca (Tabela 2, Figura 7).

As correlações altas, negativas e significativas (0,1%) (Figura 7) do pH das amostras de casca e lenho com as notas de avaliação de DFE nas áreas de plantio comercial evidenciam esta variável ser um candidato a um biomarcador de fácil acesso para se avaliara a tolerância ao distúrbio. Ainda apenas as correlações significativas acima de 50% tenham sido discutidas, as notas atribuídas às plantas avaliadas apresentaram correlação entre 41 e 42%, significativas e negativas. O pH das amostras da casca e lenho são maiores à medida que são tomados clones de eucalipto mais tolerantes ao DFE. A importância ou relação dos mesmos efeitos decorrentes das condições que resultam em um aumento do pH também atuarem sobre a concentração de quercetina na casca (QEB) é evidenciada na correlação positiva e significativa da ordem de 63%.

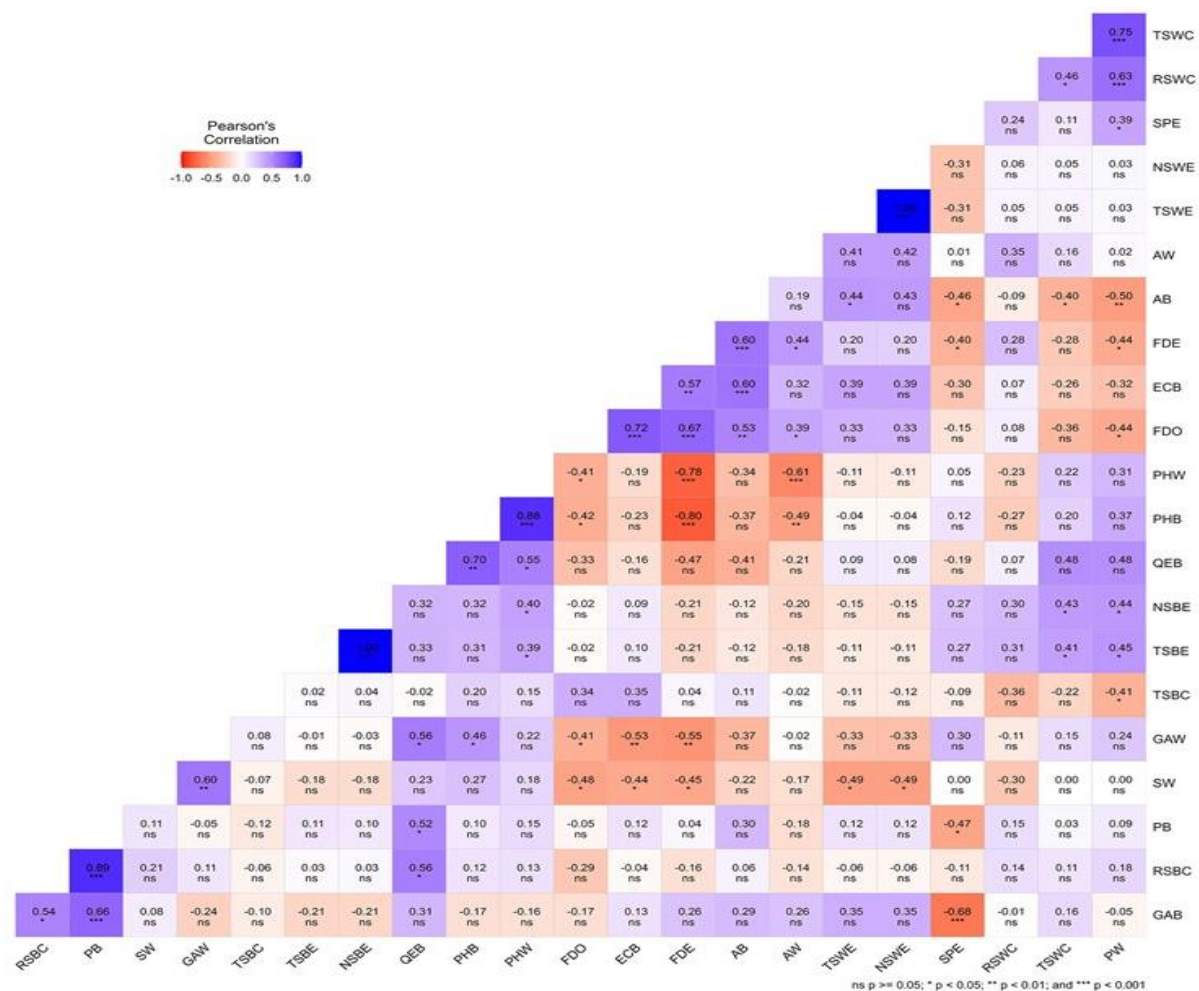
As correlações positivas e significativas em nível de 1% de probabilidade (Figura 7) evidenciam uma associação da concentração de aminoácidos na casca (AB) e condutividade elétrica das amostras de casca de eucalipto (ECB) com as notas esperadas (FDP e FDE) e notas das amostras (FDO). As correlações envolvendo as variáveis concentração de aminoácidos (AB), fenólicos (PB), condutividade elétrica (ECB) e pH (PHB e PHW) dão suporte ao envolvimento destes componentes no fenótipo de tolerância ao distúrbio fisiológico do eucalipto. Entretanto, a facilidade de acesso, as correlações significativas com uma série de outras variáveis e diretamente com as notas de distúrbio fisiológico, além da diferença significativa dos valores entre os genótipos contrastantes, evidenciam a variável pH ter um papel essencial na tolerância ao DFE. Esta função e seus desdobramentos necessitam ser melhor estudadas na cultura de eucalipto e nas possíveis respostas a diferentes tipos de estresses.

Mudanças no pH são encontradas durante as respostas de defesa das plantas contra vários estresses (KADER et al., 2007). No caso de espécies tolerantes ao sal, descobriu-se que o pH aumentou sob estresse salino e que o aumento foi atribuído ao componente iônico do estresse salino e não ao estresse osmótico (KADER et al., 2007; D'ONOFRIO e LINDBERG 2009). De acordo com Kader e Lindberg et al. (2010) é provável que o estresse salino provoque assinaturas diferenciais de pH em diferentes partes da célula para ativar mecanismos de tolerância específicos e essas assinaturas provavelmente variam entre espécies de plantas

tolerantes à salinidade e sensíveis. Acredita-se que o aumento do pH da seiva do xilema induzido pela seca atue como um sinal sistêmico de estresse hídrico de origem radicular que viaja através do apoplasto em direção às células-guarda (GEILFUS, 2017). Um sistema semelhante pode ocorrer para respostas da ocorrência do distúrbio fisiológico do eucalipto. Estes mecanismos de respostas têm a contribuir com a compreensão do que ocorre com a planta sob condições de estresse e para sua utilização como biomarcadores na separação de materiais mais e menos tolerantes aos fatores de estresse.

Além disso, os estresses por baixo aproveitamento da absorção dos nutrientes, o ferro e o manganês, por exemplo, podem ser afetados pela brusca mudança de pH do meio, e a planta possui um decréscimo do conteúdo heme, importante para o processo de formação de clorofilas e citocromos (GONÇALVES, 2021). Na ausência desses componentes, a transferência de elétrons é prejudicada, a produção de energia cessa (TAIZ et al., 2017) e a fotossíntese pode ser comprometida. Com isso, alterações na atividade enzimática, danos ao DNA e à membrana citoplasmática são alguns exemplos que o crescimento do pH pode causar nas células das plantas sobre um estresse ambiental (FOSTER, 2004). Zhang et al. (2014) relatam que as raízes são muito sensíveis as mudanças de pH e influenciam diretamente a resistência das plantas ao estresse, visto que um sistema radicular forte ajuda a resistir aos efeitos adversos do estresse.

Figura 7 – Análise de correlações de características da casca e do lenho de clones comerciais de eucalipto divergentes quanto a tolerância ao distúrbio fisiológico. AB: aminoácidos cascas; AW: aminoácidos lenho; ECB: condutividade elétrica casca; PB: concentração total de fenólicos em amostras da casca; PHB: pH casca; PHW: pH lenho; PW: concentração total de fenólicos solúveis no lenho; SW: amido lenho. RSBE: açúcares redutores casca_enzima; RSWE: açúcares redutores lenho_enzima; FDE: Fenótipo esperado -observação histórica; FDP: Fenótipo nota média de acordo com observação histórica; FDO: nota de DFE referente ao fenótipo observado na amostra; NSW: açúcares não redutores lenho_enzima; TSWE: açúcares totais lenho_enzima; QWE: concentração de quercetina em amostras de lenho; AGW: concentração de ácido gálico em amostras de lenho; SPE: pedigree - espécie ou híbrido; TSWC: concentração de açúcares totais lenho (colorimetria); RSWC: açúcares redutores lenho (colorimetria); RSBC: Açúcares redutores totais (colorimetria); GAC: ácido gálico na casca; CAC: ácido caféico na casca; TSBC: açúcares solúveis totais (colorimetria); SB: amido casca (colorimetria); PHW: pH amostras do lenho; PHB: pH amostras da casca; QEB: concentração de quercetina nas amostras da casca; TSBE: açúcares não redutores casca_enzima; ECW: condutividade elétrica (lenho) e; CAW concentração de ácido caféico em amostras do lenho. Correlações com indeterminação por falha ou perda dos dados ou ausência de variação foram excluídas da figura. FDP apresenta as mesmas informações de FDE e, por ser redundante, também foi retirada da figura.



4. CONCLUSÕES

Existe uma associação entre a composição química das amostras de casca e lenho com as respostas de clones divergentes quanto a ocorrência do DFE em condições favoráveis à ocorrência do distúrbio;

A concentração total de aminoácidos, fenólicos e açúcares não pode ser associada aos clones tolerantes ao distúrbio pelo teste de médias;

A concentração de compostos específicos como ácido cafeico, quercetina e ácido gálico pode ser correlacionada ao fenótipo, intensidade do distúrbio, exibido pela planta amostrada;

O pH da solução de amostras de casca permitiu a discriminação dos clones de acordo com o fenótipo esperado e ocorrência de DFE nas amostras.

Existe uma correlação positiva e significativa entre variáveis químicas condutividade elétrica, aminoácidos e pH da casca e pH do lenho com as notas de DFE observadas e de acordo com um histórico de ocorrência em áreas de plantio comercial.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2ª Edição, Editora UFV, Viçosa, MG, 500p, 2009.

ALMEIDA, M. N. F.; PICOLI, E. A. T.; MOULIN, J. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ZAUZA, E. A. V.; LOOS, R. A.; HALL, K. B.; GOMES, D. S.; CONCEIÇÃO, G. J.; RODRIGUES, P. D.; VIDAURRE, G. B. Propriedades da madeira como potenciais biomarcadores de tolerância a distúrbios fisiológicos: comparação de genótipos de eucalipto divergentes. **Scientia Forestalis**, v. 50, e3864, jul, 2022.

ANDRADE BUENO, I. G.; PICOLI, E. A. T.; ISAIAS, R. M. S.; LOPES-MATTOS, K. L. B.; CRUZ, C. D.; KUKI, K. N.; ZAUZA, E. A. V. Wood anatomy of field grown eucalypt genotypes exhibiting differential dieback and water deficit tolerance. **Current Plant Biology**, [S.L.], v. 22, p. 100136, jun. 2020.

BATISTA-SILVA, W.; HEINEMANN, B.; RUGEN, N.; NUNES-NESE, A.; ARAUJO, W. L.; BRAUN, H. P.; HILDEBRANDT, T. M. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. **Plant, Cell & Environment**, v. 42, n. 5, p. 1630-1644, fev. 2019.

CAETANO-MADEIRA, D. D.; OMENA-GARCIA, R. P.; ELERATI, T. L.; LOPES, C. B. S.; CORRÊA, T. R.; SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, L. A.; CRUZ, C. D.; BHERING, L. L.; NUNES-NESE, A. COSTA W. G. PICOLI, E. A. T. metabolic, nutritional and morphophysiological behavior of eucalypt genotypes differing in dieback resistance in field when submitted to PEG-induced water deficit. **Agronomy**, v. 13, n. 5, p. 1261, abr. 2023

CÂMARA A. P.; VIDAURRE G. B.; MOULIN J. C.; BOBADILHA G. S. **A relação cerne e alburno na madeira de eucalipto**, p.70-102, 2020. In.: Qualidade da madeira de eucalipto proveniente de plantações no Brasil [recurso eletrônico] / Graziela Baptista Vidaurre ... [et al.], (Organizadores). - Dados eletrônicos. - Vitória: EDUFES, 2020. 221 p.

CÂMARA, A. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; BOBADILHA, G. S.; VIDAURRE, G. B.; TOMAZELLO FILHO, M.; SOLIMAN, E. P. Physiological disorders affecting dendrometric parameters and *Eucalyptus wood* quality for pulping wood. **CERNE**, v. 24, n. 1, p. 27-34, 2018.

CARNICER, J.; COLL, M.; NINYEROLA, M.; PONS, X.; SÁNCHEZ, G.; PEÑUELAS, J. Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 4, p. 1474-1478, 10 jan. 2011.

CHA, S. J.; PARK, H. J.; KWON, S. J.; LEE, J. K.; PARK, J. H. Early detection of plant stress using the internal electrical conductivity of *Capsicum annuum* in response to temperature and salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 95, n. 3, p. 371-380, set., 2021.

CHOW, P. S.; LANDHAUSSER, S. M. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. **Tree Physiology**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1129-1136, 1 out. 2004.

CORRÊA, T. R.; PICOLI, E. A. D. T.; SOUZA, G. A. D.; CONDÉ, S. A.; SILVA, N. M.; LOPES M., K. L. B.; RESENDE, M. D. V. D.; ZAUZA, E. A. V.; ODA, S. Phenotypic markers in early selection for tolerance to dieback in Eucalyptus. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 130-138, 2017.

CUNNINGHAM, S. A.; SUMMERHAYES, B.; WESTOBY, M. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. **Ecological Monographs**, v. 69, p. 569–588, 1999.

D'ONOFRIO, C.; LINDBERG, S. Sodium induces simultaneous changes in cytosolic calcium and pH in salt-tolerant quince protoplasts. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 16, p. 1755-1763, nov., 2009.

DASGUPTA, M. G.; BURRAGONI, S.; AMRUTHA, S.; MUTHUPANDI, M.; PARVEEN, A. B. M.; SIVAKUMAR, V.; ULAGANATHAN, K. Diversity of bacterial endophyte in Eucalyptus clones and their implications in water stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 241, p. 126579, dez. 2020.

DEMIDCHIK, V.; STRALTSOVA, D.; MEDVEDEV, S. S.; POZHVANOV, G. A.; SOKOLIK, A.; YURIN, V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable

channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 5, p. 1259-1270, fev. 2014

DIAS, C. N.; PICOLI, E. A. T.; SOUZA, G. A.; FARAG, M. A.; SCOTTI, M. T.; BARBOSA FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Phenolics metabolism provides a tool for screening drought tolerant *Eucalyptus grandis* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 08, p. 1016-1025, ago, 2017.

DIAS, C.; PICOLI, E. A. T.; PORZEL, A.; WESSJOHANN, L. A.; TAVARES, J. F.; FARAG, M. A. Metabolomics characterizes early metabolic changes and markers of tolerant *Eucalyptus* ssp. clones against drought stress. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 212, p. 113715, ago. 2023.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EUROPEAN TOPIC CENTRE ON CIRCULAR ECONOMY AND RESOURCE USE (ETC/CE) Report 2023/5. **The role of bio-based textiles fibers in a circular and sustainable textiles system**. Jana Deckers Saskia Manshoven Lars Fogh Mortensen, ed., 35p, 2023. <https://www.eionet.europa.eu/etcs/etc-ce/products/etc-ce-report-2023-5-the-role-of-bio-based-textile-fibres-in-a-circular-and-sustainable-textiles-system>

FAO, 2023. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat: database – crop production**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2023.

FENSHAM, R. J.; HOLMAN, J. E. Temporal and spatial patterns in drought-related tree dieback in Australian Savanna. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, n. 6, p. 1035-1050, dez, 1999.

FLORÊNCIO, G. W. L.; MARTINS, F. B.; FAGUNDES, F. A. F. Climate change on *Eucalyptus* plantations and adaptive measures for sustainable forestry development across Brazil. **Industrial Crops and Products**, v.188, p.115538, 2022.

FOSTER, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 898-907, nov., 2004.

FRACASSO, A.; TRINDADE, L.; AMADUCCI, S. Drought tolerance strategies highlighted by two *Sorghum bicolor* races in a dry-down experiment. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 190, p. 1-14, 2016.

FU, L.; FU, B.-T.; XU, X.-R.; XU, X.-S.; QIN, R.-Y.; GAN, H.-B. LI. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. **Molecules**, v. 15, p. 8602-8617, 2010.

GEILFUS, C.-M. The pH of the Apoplast: dynamic factor with functional impact under stress. **Molecular Plant**, v. 10, n. 11, p. 1371-1386, nov., 2017.

GHAHREMANI, M.; GHANATI, F.; BERNARD, F. AZAD, T.; GHOLAMI, M.; SHARIFI, M. Ornithine modulates proline and polyamine metabolism in tobacco cells under saline conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 1, p. 91-96, 2014.

GONÇALVES, C.; RODRIGUES-JASSO, M. R.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, v. 2, p. 2046-2048, 2010.

GONÇALVES, T. M. A proposta de uma aula experimental em Biologia (Fisiologia Vegetal): vivenciando o estresse abiótico em plantas de milho (*Zea Mays* L.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e11210615511, maio, 2021.

GRANDA, V.; CUESTA, C.; ÁLVAREZ, R.; ORDÁS, R.; CENTENO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; MAJADA, J. P.; FERNÁNDEZ, B.; FEITO, I. Rapid responses of C14 clone of *Eucalyptus globulus* to root drought stress: time-course of hormonal and physiological signaling. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 7, p. 661-670, maio, 2011.

GUROVA, T. A.; DENISYUK, S. G. The relationship of cell membrane permeability of wheat seedlings with resistance of the variety. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 677, n. 4, p. 042034, mar. 2021.

HARTMANN, H.; TRUMBORE, S. Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. **New Phytologist**, v. 211, n. 2, p. 386-403, abr. 2016.

HILDEBRANDT, T. M. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during arabidopsis abiotic stress response. **Plant Molecular Biology**, v. 98, n. 1-2, p. 121-135, ago. 2018.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **Relatório Anual IBÁ 2022**. Disponível em: <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022_compactado.pdf>. Acesso em: 19 de março de 2023.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Climate Change: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. 996 p.

IWAKIRI, S. **Painéis de Madeira Reconstituída**. FUPEF, 2005.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; LAKSHMANAN, G. M. A.; GOMATHINAYAGAM, M.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 61, p. 298-303, 2008.

JANECZKO, A.; GRUSZKA, D.; POCIECHA, E.; DZIURKA, M.; FILEK, M.; JURCZYK, B.; KALAJI, H. M.; KOCUREK, M.; WALIG-ORSKI, P. Physiological and biochemical characterization of watered and drought-stressed barley mutants in the HvDWARF gene 24 encoding C6-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 99, p. 126-141, 2016.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, USA: McGraw-Hill. 1940.

JURSKIS, V. Eucalypt decline in Australia, and a general concept of tree decline and dieback. **Forest Ecology and Management**, v. 215, n. 1-3, p. 1-20, ago., 2005.

YOGALAKSHMI, K. N.; MOHAMED USMAN, T. M.; KAVITHA, S.; SACHDEVA, S.; THAKUR, S.; ADISH KUMAR, S.; RAJESH BANU, J. Lignocellulosic Biorefinery Technologies: A Perception into Recent Advances in Biomass Fractionation, Biorefineries, Economic Hurdles and Market Outlook. **Fermentation**, v. 9, n. 3, p. 238, fev. 2023.

KADER, M. A.; LINDBERG, S. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 3, p. 233-238, mar., 2010.

KADER, M. A.; LINDBERG, S.; SEIDEL, T.; GOLLDACK, D.; YEMELYANOV, V. Sodium sensing induces different changes in free cytosolic calcium concentration and pH in salt-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa*) cultivars. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 1, p. 99-111, mar., 2007.

LADANIYA, Milind. Physiological disorders and their management. **Citrus Fruit**, [S.L.], p. 625-644, 2023.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, fev. 2002.

LEHTO, T.; RUUHOLA, T.; DELL, B. Boron in forest trees and forest ecosystems. **Forest Ecology and Management**, [S.L.], v. 260, n. 12, p. 2053-2069, dez. 2010.

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

McKIERNAN, A. B.; POTTS, B. M.; BRODRIBB, T. J.; HOVENDEN, M. J.; DAVIES, N. W.; MCADAM, S. A.; ROSS, J. J.; RODEMANN, T.; O'REILLY-WAPSTRA, J. M. Responses to mild water deficit and rewatering differ among secondary metabolites but are similar among provenances within *Eucalyptus* species. **Tree Physiology**, v. 36, n. 2, p. 133-47, feb., 2016.

McMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.

MENDES, H. S. J. **Fenotipagem para estudos de tolerância à deficiência hídrica em eucalipto**. 2015. 67p. Tese (doutorado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015.

MENG, C.; QUAN, T.-Y.; LI, Z.-Y.; CUI, K.-L.; YAN, C. L.; Y.; DAI, J.-L.; XIA, G.-M.; LIU, S.-W. Transcriptome profiling reveals the genetic basis of alkalinity tolerance in wheat. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 24, 2017.

MININI, D.; GONÇALVES, F. G.; SEGUNDINHO, P. G. A.; FELBERG, M. J. K. F. S.; TINTI, V. P. Resíduo de madeira de eucalipto e adesivo tânico em painéis aglomerados. **Revista Ciência da Madeira**, v. 8, n. 2, p. 101-113, maio, 2017.

MIRANDA, I.; LIMA, L.; QUILHÓ, T.; KNAPIC, S.; PEREIRA, H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 81-87, abr. 2016.

MIRANDA, L. N. N. **Quantificação de compostos fenólicos em diferentes compartimentos arbóreos de um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2021. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (bacharelado engenharia florestal) – Instituto Federal Minas Gerais. Campus São João Evangelista, 2021.

MOKOCHINSKI, J. B.; MAZZAFERA, P.; SAWAYA, A. C. H. F.; MUMM, R.; VOS, R. C. H.; HALL, R. D. Metabolic responses of *Eucalyptus* species to different temperature regimes. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 5, p. 397-411, fev., 2018.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometris Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 176, p. 367-388, 1948.

MUELLER-DOMBOIS, D. Perspectives for an etiology of stand-level dieback. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, p. 221–243, 1986.

MUNNS, R.; MILLAR, A. H. Seven plant capacities to adapt to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 74, n. 15, p. 4308-4323, maio 2023.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, 59(2), 368-373., 1964

OLIVEIRA, F. S. **Aspectos fisiológicos e metabólicos envolvidos na resposta diferencial de clones de eucalipto a deficiência hídrica e de oxigênio**. 2014. 50 p. (Graduação em engenharia florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

OLIVEIRA, F. S. **Efeitos da irrigação com água salina no crescimento inicial e na produção de fitomassa em clones de eucalipto**. 2018. 60 p. (Dissertação em Ciências Florestais) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

PAULA, R. C.; PAULA, N. F.; MARINO, C. L. Breeding Perennial Species for Abiotic Stress. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance**. Springer, p. 157-172, 2012.

PEDROTTI, A. C. R. M; RAMOS, V. C; PRATA, A. P. N; LUCAS, A. A. T. L; SANTOS, P. B. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria**, v. 19, n. 2, mai-ago, p. 1308-1324. 2015

PICOLI, E. A. T.; RESENDE, M. D. V.; ODA, S. Come Hell or High Water: breeding the profile of eucalyptus tolerance to abiotic stress focusing water deficit. **Plant In Challenging Environments**, p. 91-127, 2021.

PIZZI, M. B. **Perdas de produtividade de 12 clones de eucalipto submetidos a desfolhas artificiais sucessivas**. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016.

RAZOUK, R.; HSSAINI, L.; ALGHOUM, M.; ADIBA, A.; HAMDANI, A. phenotyping olive cultivars for drought tolerance using leaf macro-characteristics. **Horticulturae**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 939, 13 out. 2022.

ROCHA, J. B. O. **Resiliência de clones de eucalipto ao déficit hídrico e nutricional**. 2013. 71 p. Tese (doutorado em solos e nutrição de plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

RODRIGUES, A. C. P. **Perfil de expressão gênica em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* afetados pelo distúrbio fisiológico do eucalipto (DFE)**. 2020. 142 p. Tese (doutorado em ciência floresta) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

RODRIGUES, B. P.; OLIVEIRA, J. T. S.; DEMUNER, B. J.; MAFIA, R. G.; VIDAURRE, G. B. Chemical and kraft pulping properties of young eucalypt trees affected by physiological disorders. **Forests**, v. 13, n. 4, p. 504, mar., 2022.

ROWELL, R. M.; PETERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. **Cell Wall Chemistry**. In: Wood Chemistry and Wood Composites, Rowell, R. M. (Ed.), Chapter 3. Boca Raton: Florida, 2005.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; FREIRE, C. S. R.; PASCOAL NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. **Journal of Chromatography B**, v. 938, p. 65-74, nov., 2013.

SANTOS, S. A. O.; VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; DOMINGUES, M. R. M.; PASCOAL NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D. Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* (*E. grandis*×*E. urophylla*) and *E. maidenii* bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 120-127, set. 2012.

SANTOS, S. A. O.; VILELA, C.; DOMINGUES, R. M. A.; OLIVEIRA, C. S. D. VILLAVERDE, J. J.; FREIRE, C. S. R.; PASCOAL NETO, C.; SILVESTRE, A. J. D. Secondary metabolites from *Eucalyptus grandis* wood cultivated in Portugal, Brazil and South Africa, **Industrial Crops and Products**, v. 95, p.357-364, 2017.

SCHNEIDER, F. P. **Tolerância ao frio em mudas de espécies de *Eucalyptus* spp. – aspectos morfológicos e bioquímicos**. 73 p. Tese (doutorado em produção vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

SEMBIRING, N.; NAPITUPULU, H. L.; SIPAHUTAR, A. I.; SEMBIRING, M. T. A review of sustainable replanting eucalyptus: higher sustainable productivity. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, [S.L.], v. 935, n. 1, p. 012068, set. 2020.

SHVALEVA, A. L.; SILVA, F. C. E.; BREIA, E.; JOUVE, J.; HAUSMAN, J. F.; ALMEIDA, M. H.; MAROCO, J. P.; RODRIGUES, M. L.; PEREIRA, J. S.; CHAVES, M. M. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, v. 26, n. 2, p. 239-248, fev. 2006.

SILVA, A. P. C. **Influência de distúrbios abióticos na qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose**. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Jerônimo Monteiro, 2016.

SILVA, H. K. P. **Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação em folhas de dois clones comerciais de eucalipto**. 153p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2020.

SILVA, V. E.; BUZZETTI, S.; MONTANARI, R.; PANOSSO, A. R.; MOREIRA, S. C. D.; SILVA, J. F. Influence of the climate on productivity and the eucalyptus drought response and a proposal for maximizing wood productivity in function of soil attributes in Brazil. **Ciência Florestal**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 523-547, 24 jun. 2022.

SOUZA, I. C. G. **Seleção e Melhoramento em Populações Clonais de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**. 71 p. Tese (doutorado e ciência biológicas-genética) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**, (6a ed.), 2017. 858p

TEAM, POSIT. **RStudio**: Integrated Development Environment for R. Versão: 2023.6.2.561. Boston, MA: Posit Software, 2023. Disponível em: <http://www.posit.co/>. Acesso em: 8 dez. 2023.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate. **Frontiers In Plant Science**, v. 11, p. 2-2, nov., 2020.

VIRTUOSO, M. C. S. **Estresses abióticos na germinação de sementes e no crescimento de mudas de espécies e híbridos de *Eucalyptus***. 84 p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018.

VITAL, R. G. **Mecanismos da tolerância ao déficit hídrico e à alta temperatura em cultivares de soja**. 90 p. (Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Câmpus Rio Verde, Rio Verde, 2019.

WALLIS, I. R.; FOLEY, W. J. The rapid determination of sideroxylonals in *Eucalyptus* foliage by extraction with sonication followed by HPLC. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 49-54, jan. 2005.

WHITE, D.; BEADLE, C.; WORDLEDGE, D.; HONEYSET, J.; CHERRY, M. The influence of drought on the relationship between leaf and conducting sapwood area in *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. **Trees**, v. 12, p. 406–414, 1998.

WHITLOW, T. H.; BASSUK, N. L.; RANNEY, T. G.; REICHERT, D. L. An Improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p. 198-205, jan., 1992.

ZHANG, N.; SUN, Q.; ZHANG, H.; CAO, Y.; WEEDA, S.; REN, S.; GUO, Y. D. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 647-656, ago., 2014.

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHU, J.-K. Thriving under Stress: how plants balance growth and the stress response. **Developmental Cell**, v. 55, n. 5, p. 529-543, dez., 2020.

APÊNDICE

Tabela 1 - Pressuposições de normalidade por Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias por Levene em clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE.

Variável	Valor-p (Shapiro-Wilk)	Valor-p (Levene)
TSWE	0,0380	0,5014
NSWE	0,0258	0,5476
RSWC	0,4704	0,3624
RSBE	0,0866	0,7538
TSBE	0,4403	0,5238
NSBE	0,2363	0,4513
RSWE	0,4811	0,7644
SW	0,3545	0,8104
SB	0,7161	0,8699
TSBC	0,9839	0,8358
RSBC	0,0580	0,9814
TSWC	0,2459	0,8317
PB	0,7458	0,8398
PW	0,0992	0,8782
AB	0,3175	0,5550
AW	0,7019	0,6812
PHB	0,6491	0,5263
PHW	0,9993	0,6965
ECB	0,6403	0,9025
ECW	0,6633	0,9456
AGC	0,0640	0,3342
QEC	0,0766	0,8936
CAC	0,000	1,8329
AGW	0,7263	0,9170
QEW	0,3083	0,5038
CAW	0,000	0,6806

Tabela 2 – Normalidade de Variâncias de Shapiro Wilk entre as notas observadas para as plantas amostradas (FDO), notas de DFE de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial (FDE) e a relação S/G (SGB e SGW), número de compostos detectados (BC e WC) e número de compostos detectados e não identificados (BNI e WNI), na casca (B) e no lenho (W), respectivamente.

	p
FDO	< .001
SGB	0.390
BNI	0.711
BC	0.193
SGW	0.274
WNI	0.543
WC	0.165

Nota. Um p-value pequeno sugere a violação do pressuposto da normalidade

Tabela 3 – Resumo da análise de variância entre as notas observadas para as plantas amostradas (FDO), notas de DFE de acordo com o histórico nas áreas de plantio comercial (FDE) e a relação S/G (SGB e SGW), número de compostos detectados (BC e WC) e número de compostos detectados e não identificados (BNI e WNI), na casca (B) e no lenho (W), respectivamente.

	F	gl1	gl2	p
SGB	1.58	8	18	0.199
BNI	3.65	8	18	0.011
BC	1.43	8	18	0.252
SGW	2.11	8	18	0.090
WNI	3.92	8	18	0.008
WC	3.16	8	18	0.020

Tabela 4 – Anova a um fator (não paramétrica, teste de Kruskal-Wallis para as notas observadas para as plantas amostradas (FDO)).

	χ^2	gl	p
FDO	8,64	8	< 0.038

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos compostos da casca de cada fenótipo sob o distúrbio fisiológico do eucalipto, dados da análise de pirólise.

Compostos	Número de amostras com a detecção do composto	Tolerante		Moderadamente tolerante		Suscetível	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Relação siringil/guaiacil	27	1,21	0,07	1,84	0,15	1,99	0,09
Hexose	14	7,25	2,23	2,38	2,53	3,19	0,60
2-propanona, 1-hidroxi	22	8,71	1,19	8,20	0,28	4,30	0,33
Oxazolidine, 2,2-dietil-3-metil	25	4,83	0,23	3,26	0,51	3,75	0,24
Dióxido de carbono	26	4,16	0,91	10,40	1,42	12,99	2,35
Siringol	27	2,69	0,69	2,64	0,06	2,96	1,02
Beta-d-ribopiranosídeo, metil, 3-acetato	13	1,22	1,12	0,63	0,32	0,73	0,22
4-vinilguaiacol	25	2,17	0,40	1,73	0,28	1,88	0,45
1,3-di-o-acetil-.alfa.-.beta-d-ribopiranosose	18	2,05	0,41	1,08	0,77	0,94	0,29
Catecol	1	0,45	0,78	0,00	0,00	0,00	0,00
Guaiacol	26	1,58	0,63	1,00	0,06	0,75	0,20
1,4:3,6-dianidro- α -d-glicopiranosose	24	1,15	0,18	0,60	0,09	0,72	0,05
Pirocatecol, 3-metoxi-	22	0,89	0,35	0,72	0,21	0,61	0,13
Pirocatecol	13	1,09	1,12	0,90	0,15	0,57	0,50
Pirualdeído	3	0,00	0,00	0,00	0,00	3,55	6,15

Tabela 6 - Média e desvio padrão dos compostos do lenho de cada fenótipo sob o distúrbio fisiológico do eucalipto, dados da análise de pirólise.

Compostos	Número de amostras com a detecção do composto	Tolerante		Moderadamente tolerante		Suscetível	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Relação siringil/guaiacil	27	6,58	2,38	5,39	0,99	4,38	0,21
Ácido acético	27	17,43	1,82	16,16	1,52	14,77	1,09
Dióxido de carbono	27	11,77	1,00	8,67	2,09	5,25	2,45
Pirualdeído	13	6,37	0,53	1,88	3,26	1,66	2,88
Oxazolidine, 2,2-dietil-3-metil	27	4,30	0,82	3,24	0,96	2,68	0,50
Furfural	16	1,53	0,25	0,53	0,53	0,69	0,62
4-metilguaiacol	27	1,49	0,47	0,76	0,18	0,87	0,29
Metileugenol	20	1,45	0,28	1,29	0,22	1,27	0,33
3,5-Dimetoxi-4-hidroxitolueno	15	4,97	0,78	4,11	2,49	2,08	3,61
Siringaldeído	24	1,12	0,41	1,42	0,12	1,63	0,44
Trans-4-propenilsiringol	8	1,90	2,86	3,22	3,02	1,68	2,92
Guaiacilacetona	12	0,42	0,05	0,35	0,10	0,36	0,31
1,4:3,6-dianidro- α -d-glicopiranoose	10	0,86	0,47	0,25	0,25	0,10	0,17
4-Metil-2,5-dimetoxibenzaldeído	17	4,85	4,23	5,34	4,64	7,62	0,99
Cinamaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxi	15	0,00	0,00	2,61	0,48	2,42	0,21
4-vinilguaiacol	18	0,00	0,00	2,37	0,07	2,82	0,49
Óxido de etileno	11	0,00	0,00	5,24	0,74	2,00	3,47
2-ciclopenten-1-ona, 2-hidroxi-	10	0,00	0,00	4,75	0,92	5,76	0,64
Metilsiringol	10	0,00	0,00	1,59	2,75	4,83	0,92

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para as concentrações de açúcares redutores da casca por enzima (RSBE), açúcares totais na casca por enzima (TSBE), açúcares não-redutores na casca por enzima (NSBE), açúcares redutores do lenho por enzima (RSWE), açúcares totais lenho enzima (TSWE), açúcares não redutores lenho por enzima (NSWE), amido no lenho (SW) amido na casca (SB), açúcares totais na casca por colorimetria (TSBC), açúcares redutores da casca por colorimetria (RSBC), açúcares totais do lenho por colorimetria (TSWC), açúcares redutores lenho por colorimetria (RSWC), fenólicos totais na casca (PB), fenólicos totais no lenho (PW), aminoácidos na casca (AB), aminoácidos no lenho (AW), pH da casca (PHB), pH do lenho (PHW), condutividade elétrica da casca (ECB) e condutividade elétrica do lenho (ECW) da relação da concentração da casca e do lenho estimados por colorimetria, para clones comerciais de eucalipto divergentes para o fenótipo de DFE.

FV	GL	Quadrados médios									
		RSBE	TSBE	NSBE	RSWE	TSWE	NSWE	SW	SB	TSBC	RSBC
Genótipo	8	0,00001 ^{ns}	0,0038 ^{ns}	0,0034 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,0771 ^{**}	0,0758 ^{**}	9,0711 ^{**}	8,4362 ^{ns}	10,2932 ^{ns}	38,5335 ^{ns}
Bloco	2	0,00001 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,0008 ^{ns}	0,0008 ^{ns}	1,5973 ^{ns}	1,0446 ^{ns}	0,1964 ^{ns}	31,0235 ^{ns}
Resíduo	16	0,00001 ^{ns}	0,0021 ^{ns}	0,0019 ^{ns}	0,00001 ^{ns}	0,0048 ^{ns}	0,0047 ^{ns}	1,6899 ^{ns}	10,4108 ^{ns}	6,5851 ^{ns}	69,8968 ^{ns}
CV (%)		11,09	24,48	30,35	8,81	11,50	12,09	34,73	28,44	29,41	39,60

FV	GL	Quadrados médios									
		TSWC	RSWC	PB	PW	AB	AW	PHB	PHW	ECB	ECW
Genótipo	8	0,1652 ^{ns}	13,4808 ^{**}	5,5771 ^{**}	1,3385 ^{**}	0,0302 ^{**}	0,0328 ^{**}	1,3423 ^{**}	1,7359 ^{**}	6,1907 ^{**}	53,8896 ^{ns}
Bloco	2	0,5170 ^{ns}	12,5567 ^{ns}	2,2750 ^{ns}	1,4459 ^{ns}	0,0179 ^{ns}	0,0443 ^{ns}	0,0146 ^{ns}	0,0480 ^{ns}	0,5155 ^{ns}	14,9061 ^{ns}
Resíduo	16	0,1669 ^{ns}	4,4489 ^{ns}	1,7977 ^{ns}	0,4018 ^{ns}	0,0074 ^{ns}	0,0078 ^{ns}	0,0568 ^{ns}	0,0125 ^{ns}	1,0080 ^{ns}	58,6116 ^{ns}
CV (%)		35,77	16,70	34,37	27,96	6,85	7,52	4,59	1,97	10,84	25,26

^{ns} não significativo, ^{**} significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, FV: fonte de variação, GL: graus de liberdade, CV: coeficiente de variação.