

PATRICIA RAMALHO DE BARROS

**IMPORTÂNCIA DO CÁLCIO NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO
HÍDRICA EM EUCALIPTO**

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

Orientador: Nairam Félix de Barros

Coorientadores: Alice Pita Barbosa
Samuel Vasconcelos Valadares

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

B277i
2022 Barros, Patricia Ramalho de, 1993-
Importância do cálcio na mitigação dos efeitos da restrição
hídrica em eucalipto / Patricia Ramalho de Barros. – Viçosa,
MG, 2022.

1 tese eletrônica (89 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Nairam Félix de Barros.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Solos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.514>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Eucalipto - Resistência à seca. 2. Plantas - Efeito do
cálcio. 3. Déficit hídrico. I. Barros, Nairam Félix de, 1945-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos.
Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas.
III. Título.

CDD 22. ed. 634.9612

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

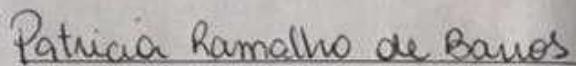
PATRICIA RAMALHO DE BARROS


**IMPORTÂNCIA DO CÁLCIO NA MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO
HÍDRICA EM EUCALIPTO**

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

APROVADA: 11 de maio de 2022.

Assentimento:


Patricia Ramalho de Barros
Autora


Nairam Félix de Barros
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar em todos os momentos da minha vida, me conduzir, proteger, sempre mostrando os caminhos nas horas incertas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade de realização do meu curso.

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

Ao professor Nairam Félix de Barros, pela orientação, confiança, conselhos, ensinamentos desde a minha graduação.

À professora Alice Pita Barbosa, pela coorientação, por toda ajuda, ensinamentos e conselhos ao longo de toda minha vida acadêmica.

Ao professor Samuel Vasconcelos Valadares pela coorientação e pelo grande incentivo na realização desse trabalho.

Aos membros da banca de avaliação desta tese, Prof. Hermínia Martinez, Prof. Samuel Valadares, Prof. Wagner Araújo e Dr. Juscimar da Silva.

Aos amigos do DPS, por toda amizade e pelos bons momentos vividos durante esse período da pós-graduação. Em especial aos queridos Marcel, Rayanne, André, Carol, Klever, Ricardo, Fernanda, Écio, Gêssica, Francis, Nathalie e Larissa.

Aos amigos que me ajudaram na realização deste trabalho. Em especial, ao Ricardo, Écio, Filipe, Gêssica, Leonardo, Karol, Jailson, Hellen, Marcele, Marcelo e Júlia.

Ao Samuelson, por toda ajuda durante a condução do experimento e por sempre tentar me acalmar nos momentos de desespero.

Aos meus pais, Camilo e Ana Lúcia, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são meus maiores exemplos de vida.

Ao meu irmão Paulo, por ser tão especial e companheiro nessa minha caminhada.

Ao meu marido Rodrigo, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Por todo carinho, amor e cuidado, além de toda ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus sogros, Domingos e Leoneza, por todo cuidado e amor durante todos esses anos em Viçosa.

A todos que torceram por mim e que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

*All our dreams can come true, if we have the
courage to pursue them.*

Walt Dinesy

RESUMO

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Importância do cálcio na mitigação dos efeitos da restrição hídrica em eucalipto.** Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Samuel Vasconcelos Valadares

O cultivo de eucalipto está entre as atividades do setor florestal mais importantes para a economia brasileira e mundial. Recentemente, o déficit hídrico tem sido o fator abiótico que tem mais afetado o crescimento e a sobrevivência dessas florestas. Por este motivo, a seleção de clones mais tolerantes à seca tem sido uma das principais estratégias adotadas nos novos plantios. No entanto, é necessário compreender os mecanismos responsáveis pela tolerância à seca nessas plantas e a influência dos nutrientes nesses processos. Diversos estudos têm dado foco ao nutriente cálcio (Ca), como importante mitigador da tolerância à seca em plantas. Assim, o objetivo desta tese foi identificar a importância do Ca nos mecanismos de tolerância à seca e os mecanismos e efeitos do suprimento deste nutriente na expressão dos transportadores de Ca (MCA1 e ACA11) e das proteínas intrínsecas de membranas (PIP) em raízes de eucalipto. Para atingir esses objetivos, mudas do clone de eucalipto VM01 (*E. urophylla* × *camaldulensis*), caracterizado como tolerante à seca, foram cultivadas em sistema hidropônico na presença ou ausência de Ca e submetidas à restrição hídrica pelo uso de polietilenoglicol 6000. Os resultados obtidos mostram que a restrição hídrica aumenta a expressão do *ACA11* (transportador de Ca do vacúolo) e diminui a expressão do *MCA1* (transportador de Ca na endoderme). Isso resulta em maior concentração de Ca nas raízes do clone VM01 em condições de seca. Esse fato favorece o crescimento de raiz e maior relação raiz/parte aérea, importantes características que favorecem a sobrevivência das plantas em condições de déficit hídrico. As plantas cultivadas na presença de Ca sob restrição hídrica apresentaram maior hidratação, menores danos oxidativos e maior atividade de enzima antioxidante. Além disso, observou-se que em geral no início da seca houve regulação positiva das PIP (aquaporinas), uma estratégia importante para aumentar a absorção de água. Por outro lado, com aumento do tempo de seca a regulação gênica foi negativa, estratégia também importante para evitar a perda de água. Dessa forma, espera-se que o trabalho auxilie na identificação de mecanismos para a seleção de clones tolerantes a seca, contribuindo para proteção e manejo de plantios de eucalipto.

Palavras-chave: Tolerância à seca. Nutrição. Aquaporinas. Transportadores de cálcio

ABSTRACT

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Importance of calcium in mitigating the effects of water restriction in Eucalyptus.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Alice Pita Barbosa and Samuel Vasconcelos Valadares

Eucalyptus plantations is among the most important activities in the forestry sector for the Brazilian and world economy. Recently, water deficit has been the abiotic factor that has most affected the growth and survival of these forests. For this reason, selecting of drought tolerant clones has been one of the main strategies for new plantations. However, it is necessary to understand the drought tolerance mechanisms and the influence of nutrients on drought tolerance processes. Thus, the objective of this thesis was to identify the importance of Ca in the mechanisms of drought tolerance and the mechanisms and effects of the supply of this nutrient on the expression of Ca transporters (*MCA1* and *ACA11*) and intrinsic membrane proteins (PIP) in roots of eucalyptus. To achieve these objectives, seedlings of eucalyptus clone VM01 (*E. urophylla* × *camaldulensis*), characterized as drought tolerant, were grown in a hydroponic system in the presence or absence of Ca and subjected to water restriction using polyethylene glycol 6000. The results showed that water restriction increases the expression of *ACA11* (carrier of Ca in the vacuole) and decreases the expression of *MCA1* (carrier of Ca in the endodermis). This results in a higher concentration of Ca in the roots of clone VM01 under drought conditions. This fact favors root growth and a greater root/shoot ratio that are important characteristics to plant survival under water restriction. That plants that are grown in the presence of Ca under water restriction have greater hydration, less oxidative damage and greater antioxidant enzyme activity. In addition, it was observed that, in general, at the beginning of the drought there was positive regulation of PIP, an important strategy to increase water absorption. On the other hand, with increased drought time, gene regulation was negative, which is also an important strategy to avoid water loss. Thus, it is expected that this work helps identifying and selecting drought-tolerant clones and contribute to the protection and management of eucalyptus plantations.

Keywords: Drought tolerance. Nutrition. Aquaporins. Calcium transporters

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1. <i>Condições de crescimento das plantas e desenho experimental</i>	19
2.2. <i>Determinação do teor, conteúdo e eficiência de translocação de cálcio</i>	20
2.3. <i>Características morfológicas</i>	21
2.4. <i>Análise de expressão gênica dos transportadores de cálcio</i>	21
2.5. <i>Análises estatística</i>	23
3. RESULTADOS	23
3. DISCUSSÃO.....	31
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
CAPITULO 2	42
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
1.1. <i>Condições de crescimento das plantas e desenho experimental</i>	47
1.2. <i>Status hídrico e fotossíntese</i>	48
1.3. <i>Estresse oxidativo</i>	48
1.4. <i>Extravasamento de eletrólitos</i>	49
1.5. <i>Determinação da atividade de enzimas antioxidantes</i>	50
1.6. <i>Análises estatísticas</i>	50
3. RESULTADOS	51
4. DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
CAPITULO 3.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1. <i>Condições de crescimento das plantas e desenho experimental</i>	73
2.2. <i>Coleta do material vegetal</i>	74

2.3. <i>Potencial hídrico foliar</i>	SUMÁRIO	75
2.4. <i>Expressão gênica</i>		75
2.5. <i>Análises estatísticas</i>		77
2. RESULTADOS		77
4. DISCUSSÃO		82
5. CONCLUSÕES		85
REFERÊNCIAS		86

INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por produtos florestais tem levado à expansão das áreas com florestas plantadas em todo o mundo. As plantações florestais ocupam uma área de aproximadamente 7% de toda área florestal global, totalizando 80 milhões de hectares em diversos países (Payn et al., 2015; Carle et al., 2020). O gênero *Eucalyptus* possui mais de 900 espécies cultivadas em todo o globo. As plantações de eucalipto ocupam, aproximadamente 20 milhões de hectares distribuídos em mais de 90 países (ENCE, 2009; Ferreira et al., 2019). Esse gênero é de grande interesse econômico por apresentar, crescimento rápido, adaptabilidade e propriedades superiores da madeira, além de ser matéria-prima para indústrias de papel e celulose (Ghosh Dasgupta and Dharanishanthi, 2017).

Com a ocorrência das mudanças climáticas, prevê-se que a seca seja mais intensa e frequente em muitas regiões do mundo (Trenberth et al., 2014). A seca foi considerada o principal estresse abiótico limitante do crescimento e produtividade das plantações florestais (Allen et al., 2010; Bennett et al., 2015; Duke et al., 2017). Segundo Stape et al. (2010), o déficit hídrico além de reduzir o crescimento pode levar à morte de indivíduos ou florestas inteiras

Para mitigar os efeitos da restrição hídrica, a escolha de genótipos tolerantes à seca é a principal estratégia adotada para estabelecer novas plantações de eucalipto (Bison et al., 2007). Alguns estudos têm demonstrado adaptações diferenciais de materiais genéticos de eucalipto plantados em regiões com restrições hídricas (Camargo et al., 2008). A elucidação dos mecanismos que conferem a alguns materiais genéticos maior adaptabilidade, maiores taxas de crescimento e estabilidade da produção em ambientes sujeitos à restrição hídrica é necessária para auxiliar no melhoramento florestal e na escolha de genótipos mais indicados para cultivo de eucalipto no campo.

A adequada nutrição mineral é um fator importante que contribui para redução dos efeitos da seca nas plantas. Dentre os nutrientes minerais o cálcio (Ca) é considerado um

importante nutriente para manutenção do crescimento e produtividade das plantas, além de mitigar os efeitos do déficit hídrico (Lundqvist et al., 2017; Naeem et al., 2017, 2020; Khushboo et al., 2018; Rezayian et al., 2018, 2020; Huang et al., 2019; Leng et al., 2020; Abbas et al., 2021). O entendimento do papel do Ca no aumento da tolerância à seca em eucalipto é de extrema importância para o setor florestal. Portanto, este estudo buscou compreender os efeitos do suprimento de Ca na expressão de transportadores de Ca e proteínas intrínsecas de membranas (PIP), em características morfológicas e em processos fisiológicos chaves, como a fotossíntese, o status hídrico e a homeostase oxi-redutiva em um clone de eucalipto tolerante à seca.

REFERÊNCIAS

- Abbas M, Abdel-Lattif H, Shahba M. Ameliorative Effects of Calcium Sprays on Yield and Grain Nutritional Composition of Maize (*Zea mays* L.) Cultivars under Drought Stress. *Agric* 2021, Vol 11, Page 285. 2021;11:285. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11040285>
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted., Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol Manage.* 2010;259:660-84. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2009.09.001>
- Bennett AC, McDowell NG, Allen CD, Anderson-Teixeira KJ. Larger trees suffer most during drought in forests worldwide. *Nat Plants.* 2015;1. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.139>
- Bison O, Ramalho MAP, Rezende GDSP, Aguiar AM, Resende MDV de. Combining ability of elite clones of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* with *Eucalyptus globulus*. *Genet Mol Biol.* 2007;30:417-22. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300019>
- Camargo MLP de, Moraes CB de, Mori ES, Guerrini IA, Mello EJ de, Oda S. Considerações sobre eficiência nutricional em *Eucalyptus*. *Científica.* 2008;32:191-6. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2004v32n2p191-196>
- Carle JB, Duval A, Ashfordc S. The future of planted forests. *Int For Rev.* 2020;22:65-80. <https://doi.org/10.1505/146554820829523970>
- Duke NC, Kovacs JM, Griffiths AD, Preece L, Hill DJE, Van Oosterzee P, Mackenzie J, Morning HS, Burrows D. Large-scale dieback of mangroves in Australia's Gulf of Carpentaria:

a severe ecosystem response, coincidental with an unusually extreme weather event. *Mar Freshw Res.* 2017;68:1816-29. <https://doi.org/10.1071/MF16322>

Ferreira V, Boyero L, Calvo C, Correa F, Figueroa R, Gonçalves JF, Goyenola G, Graça MAS, Hepp LU, Kariuki S, López-Rodríguez A, Mazzeo N, M'Erimba C, Monroy S, Peil A, Pozo J, Rezende R, Teixeira-de-Mello F. A Global Assessment of the Effects of Eucalyptus Plantations on Stream Ecosystem Functioning. *Ecosystems.* 2019;22:629-42. <https://doi.org/10.1007/S10021-018-0292-7/FIGURES/3>

Ghosh Dasgupta M, Dharanishanthi V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. *Gene.* 2017;627:393-407. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.050>

Huang LY, Li ZZ, Duan TY, Wang L, Zhang YQ, Li J. Regulation of exogenous calcium on photosynthetic system of honeysuckle under salt stress. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 2019;44:1531-6. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20190322.101>

Khushboo, Bhardwaj K, Singh P, Raina M, Sharma V, Kumar D. Exogenous application of calcium chloride in wheat genotypes alleviates negative effect of drought stress by modulating antioxidant machinery and enhanced osmolyte accumulation. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2018;54:495-507. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9912-3>

Leng X, Xue L, Wang J, Li S, Yang Z, Ren H, Yao X, Wu Z, Li J. Physiological responses of *handeliendron bodinieri* (Levl.) rehd. to exogenous calcium supply under Drought stress. *Forests.* 2020;11:1-14. <https://doi.org/10.3390/f11010069>

Lundqvist SO, Grahn T, Olsson L, Seifert T. Comparison of wood, fibre and vessel properties of drought-tolerant eucalypts in South Africa. *South For.* 2017;79:215-25. <https://doi.org/10.2989/20702620.2016.1254910>

Naeem M, Ansari AA, Gill SS. Essential plant nutrients: Uptake, use efficiency, and management. *Essent Plant Nutr Uptake, Use Effic Manag.* 2017:1-569. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4>

Naeem M, Traub JR, Athar H ur R, Loescher W. Exogenous calcium mitigates heat stress effects in common bean: a coordinated impact of photoprotection of PSII, up-regulating antioxidants, and carbohydrate metabolism. *Acta Physiol Plant.* 2020;42:180. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03171-4>

Payn T, Carnus JM, Freer-Smith P, Kimberley M, Kollert W, Liu S, Orazio C, Rodriguez L, Silva LN, Wingfield MJ. Changes in planted forests and future global implications. *For Ecol Manage.* 2015;352:57-67. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2015.06.021>

Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Improving tolerance against drought in canola by penconazole and calcium. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;149:123-36. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.007>

Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Penconazole and calcium ameliorate drought stress in canola by upregulating the antioxidative enzymes. *Funct Plant Biol.* 2020;47:825-39. <https://doi.org/10.1071/FP19341>

Stape J, Binkley D, Ryan M, Fonseca S, Loos R, Takahashi E, Silva C, Silva S, Hakamada R,

Fereira J, Lima A, Gava J, Leite F, Andrade H, Alves J, Silva G, Azevedo M. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. *For Ecol Manage.* 2010;259:1684-94.
<https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2010.01.012>

Trenberth KE, Dai A, Van Der Schrier G, Jones PD, Barichivich J, Briffa KR, Sheffield J. Global warming and changes in drought. *Nat Clim Chang.* 2014;4:17-22.
<https://doi.org/10.1038/nclimate2067>

CAPÍTULO 1

A RESTRIÇÃO HÍDRICA INFLUENCIA O ACÚMULO DE CÁLCIO E A EXPRESSÃO DE SEUS TRANSPORTADORES NAS RAÍZES DE CLONE DE EUCALIPTO TOLERANTE À SECA

RESUMO

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **A restrição hídrica influencia o acúmulo de cálcio e a expressão de seus transportadores nas raízes de clone de eucalipto tolerante à seca.** Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Samuel Vasconcelos Valadares

O cálcio (Ca) é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A absorção de Ca pelas plantas é intermediada por uma variedade de transportadores localizados na membrana plasmática das raízes. Evidências sugerem que clones de eucalipto com alta tolerância à seca possuem maior capacidade de absorção e acúmulo de Ca nas raízes. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito da restrição hídrica na expressão dos transportadores de cálcio *MCAI* (transportador de Ca na endoderme) e *ACAI1* (transportador de Ca do vacúolo) nas raízes de um clone de eucalipto tolerante à seca. Além disso, foi avaliada a concentração de cálcio e as características morfológicas das plantas. Plantas do clone de eucalipto VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*), considerado tolerante à seca, foram cultivadas em sistema hidropônico na presença ou ausência de Ca e submetidas à restrição hídrica pelo uso de polietilenoglicol 6000. A restrição hídrica ocasionou redução na expressão gênica do gene *MCAI* e aumento do gene *ACAI1*, o que resultou maior acúmulo de Ca nas raízes e menor translocação para parte aérea. Estas plantas, também apresentaram maior relação raiz/parte aérea e maior biomassa radicular, sendo uma importante estratégia desse clone para tolerar períodos de seca. Além disso, a presença de Ca na solução de cultivo favoreceu características relacionadas à morfologia das raízes, como volume, comprimento total e área de superfície.

ABSTRACT

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Water restriction influences calcium accumulation and the expression of its transporters in roots of drought-tolerant eucalyptus clones.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Alice Pita Barbosa and Samuel Vasconcelos Valadares

Calcium (Ca) is an essential element for plant growth and development. The uptake of Ca by plants involves a variety of transporters located in the plasma membrane of the roots. Evidences suggest that eucalyptus clones with high tolerance to drought have a greater capacity to absorb and accumulate Ca in the roots. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of water restriction on the expression of calcium transporters MCA1 (endodermal Ca transporter) and ACA11 (vacuole Ca transporter) in the roots of a drought-tolerant eucalyptus clone. In addition, the Ca concentration and morphological characteristics of the plants were evaluated. Plants of the drought tolerant eucalyptus clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*) were grown in a hydroponic system in the presence or absence of Ca and subjected to water restriction using polyethylene glycol 6000. Water restriction reduced the expression of *MCA1* and increased *ACA11*. This resulted in a greater Ca accumulation in the roots and less translocation to the shoot. These plants also showed higher root/shoot ratio and higher root biomass, which is an important strategy for this clone to tolerate periods of drought. In addition, the presence of Ca in the solution favored characteristics related to root morphology, such as root volume, total length and surface area.

1. INTRODUÇÃO

A seca é considerada um dos principais eventos climáticos que impactam negativamente a produtividade e o crescimento florestal em nível global (Anderegg et al., 2012; Choat et al., 2012; Allen et al., 2015). Sob condições de déficit hídrico as plantas desenvolvem estratégias para preservação do crescimento e da sobrevivência (Anjum et al., 2011; Hamanishi e Campbell, 2011).

Espécies arbóreas mais adaptadas a ambientes com baixa disponibilidade hídrica tendem a aumentar a alocação de fotoassimilados na raiz, resultando em maior biomassa deste órgão em detrimento à parte aérea (Markesteyn and Poorter, 2009; Hartmann, 2011; Christina et al., 2017; Campoe et al., 2020; Müller et al., 2020). O aumento da biomassa associado ao maior crescimento, maior profundidade e à proporção de raízes finas contribui para maior da absorção de água e para a redução das perdas por transpiração (Brunner et al., 2015a), sendo, também, considerados importantes indicadores de tolerância à seca em árvores (Caione et al., 2012; Valdés et al., 2013a; Santos et al., 2016). Um sistema radicular bem desenvolvido, também é fundamental para ampliar a exploração do perfil de solo, otimizando a aquisição de nutrientes (Forde and Lorenzo, 2002; Costa e Silva et al., 2004; Valdés et al., 2013b).

O cálcio (Ca) é considerado um macronutriente fundamental para o crescimento e desenvolvimento das raízes (Sharma et al., 2017). Esse nutriente é um importante componente das pectinas, as quais, por sua vez, são importantes componentes das paredes celulares primárias, predominantes em regiões em crescimento (Demarty et al., 1984). A deficiência de Ca inibe fortemente o alongamento das raízes (Gruber et al., 2013; Giehl and von Wirén, 2014), além de afetar a arquitetura radicular (Cao et al., 2013; Liu et al., 2019), resultando em plantas com raízes mais curtas, espessas, muito ramificadas, quebradiças e com coloração acastanhada (Chen et al., 2018).

A absorção de Ca pelas células da raiz ocorre através de uma variedade de transportadores permeáveis ao Ca^{2+} , localizados na membrana plasmática (White, 2000; Marschner, 2012). Uma vez dentro das raízes, os íons Ca^{2+} podem ser translocados para parte aérea ou serem armazenados na parede celular e/ou organelas (Demarty et al., 1984; Pinto and Ferreira, 2015; Kuronuma and Watanabe, 2021). Dentre as organelas, o vacúolo é considerado o maior depósito de armazenamento de Ca das células vegetais (Peiter, 2011; Pinto and Ferreira, 2015). A classe de transportadores vacuolares que controla a homeostase e o influxo de Ca para o vacúolo é denominada Ca-ATPases autoinibidas (ACAs) (Schönknecht, 2013; García Bossi et al., 2020). Dentre eles, o ACA11 está localizado no tonoplasto de grandes vacúolos das células epidérmicas radiculares, favorecendo o influxo de Ca do citoplasma para essa organela (Pittman, 2011; Pinto and Ferreira, 2015; García Bossi et al., 2020). Porém, não existem trabalhos que demonstrem a relação entre ACA11 e acúmulo de cálcio nas raízes do eucalipto.

Quando não armazenado nas células da raiz, o Ca é translocado para a parte aérea das plantas pelas vias apoplástica e simplástica (White and Broadley, 2003; Thor, 2019). O movimento de Ca por essas duas vias é bem balanceado. Um modelo comum sugere que ele se move pela via apoplástica pelas células do córtex até atingir a endoderme (White, 2001). No entanto, ao atingir os limites da endoderme, o Ca é barrado pelas estrias de Caspary, sendo o influxo no citosol das células endodérmicas uma etapa essencial para que o Ca chegue ao xilema. Esse influxo ocorre através dos transportadores de Ca (White, 2000; White and

Broadley, 2003; Kumar et al., 2015). Em *Arabidopsis thaliana*, a proteína canal mecanossensível permeável ao Ca^{2+} (MCA1), localizada na membrana plasmática das células endodérmicas da raiz, é sugerida como uma forte candidata à realização desse processo (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010). Em espécies do gênero *Eucalyptus* ainda não foram encontrados trabalhos que relacionam o influxo de Ca nas células endodérmicas das raízes através dessa proteína.

Evidências sugerem uma relação entre a absorção e acúmulo do Ca e o aumento da tolerância à seca em genótipos de eucalipto. Clones de eucalipto com alta tolerância a seca apresentam maior concentração de cálcio nas raízes e/ou aumentos significativos no crescimento radicular em condições de déficit hídrico (Barros Filho, 2014; Müller et al., 2017; Barros, 2018; Souza, 2019). Apesar disso, os mecanismos envolvidos no processo de absorção e acúmulo de Ca em clones de eucalipto com alta tolerância à seca ainda não são completamente compreendidos.

O objetivo deste estudo é compreender a relação entre tolerância à seca, concentração de Ca e o maior crescimento das raízes, e lançar luz sobre o mecanismo que regula este processo em um clone de eucalipto tolerante à seca. Nossa hipótese é de que: i) a maior concentração do Ca em condições de seca pode compor um mecanismo de tolerância ao déficit hídrico e ii) esse mecanismo ocorre por meio da regulação da expressão de genes que codificam transportadores de Ca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Condições de crescimento das plantas e desenho experimental*

Foram utilizadas mudas de três meses de idade (~ 30 cm de comprimento) do clone de eucalipto VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*). Esse clone foi previamente caracterizado como altamente tolerante à seca (Fernandes et al., 2015; Martins et al., 2018; Santos et al., 2021). As mudas foram aclimatadas em casa de vegetação, em vasos de polietileno (3 L) contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1982), adaptada por Locatelli et al. (1984), sob aeração constante e pH próximo a 6. Na fase inicial do período de aclimação, a solução de cultivo teve força iônica equivalente a 50% da solução final. Gradualmente, a força iônica da solução foi elevada até 100 % da solução padrão. As trocas de solução foram

realizadas semanalmente (Pinto et al., 2011).

Após 15 dias de aclimação, as plantas foram submetidas aos tratamentos com presença ou ausência de cálcio (Ca) durante 12 dias. Após esse período a restrição hídrica foi imposta pelo uso de polietilenoglicol (PEG 6000) que foi adicionado à solução de cultivo das plantas. Foi adicionada a dose 235g de PEG 6000 de maneira gradativa em um intervalo de dez dias até que o potencial hídrico da solução atingisse $-0,65$ MPa (Michel e Kaufmann, 1973). Seis dias após a solução atingir o potencial hídrico de $-0,65$ MPa, ou seja, 16 dias após o início da imposição da restrição hídrica, foram realizadas as coletas do material vegetal. A solução nutritiva para reposição dos nutrientes foi trocada a cada seis dias. O experimento foi delineado em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2×2 : presença ou ausência de restrição hídrica \times presença ou ausência de cálcio (+Ca e -Ca), com cinco repetições. Para as análises de expressão gênica foram usadas quatro repetições.

2.2. *Determinação do teor, conteúdo e eficiência de translocação de cálcio*

Amostras da parte aérea e de raízes foram coletadas ao final do experimento (16º dia) e secadas em estufa de circulação de ar forçado à temperatura de 65 °C, até atingir peso constante. Posteriormente, as amostras da parte aérea e de raízes foram moídas em moinho tipo Wiley, passadas em peneira com malha de $0,5$ mm e submetidas à digestão nitroperclórica (Johnson and Ulrich, 1959). O teor de cálcio foi determinado por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES Horiba, Ultima Expert) (ICP-AES). O conteúdo de Ca foi calculado multiplicando-se o teor de Ca pela massa seca das plantas (parte aérea e raiz). A eficiência de translocação (ET) de cálcio nas plantas foi calculada conforme equação a seguir (Li et al., 1991).

$$ET = \frac{\text{Conteúdo de Ca na parte aérea (mg)}}{\text{Conteúdo de Ca na planta (mg)}}$$

2.3. *Características morfológicas*

As características morfológicas do sistema radicular (comprimento, volume, área de superfície e diâmetro médio das raízes) foram obtidas pelo sistema de análise de imagem WinRHIZO® Software (WinRHIZO Pro, Regent Inc. Instr., Canada). A determinação da área foliar total foi realizada por um medidor de área foliar (LI-3100C; LI-COR BIOSCIENSES INC., 2004). A massa de matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas foi determinada ao final do experimento, após secagem em estufa (65 ° C) até atingirem massa constante e posteriormente pesadas em balança analítica. A partir da massa de matéria seca foi calculada a razão raiz/parte aérea.

2.4. *Análise de expressão gênica dos transportadores de cálcio*

As análises de expressão gênica foram realizadas em amostras de ápices de raízes com aproximadamente 5 cm de comprimento. O material foi coletado e imediatamente colocado em nitrogênio líquido, armazenado a -80 °C e posteriormente macerado em almofariz. O RNA total foi extraído das raízes de quatro repetições biológicas de acordo com Chang et al. (1993), com algumas modificações. Foi preparado o tampão de extração contendo 2% CTAB, 2% PVP-40, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) e 25 mM EDTA (pH 8,0). Posteriormente, o tampão de extração foi pré-aquecido a 65 °C e adicionado, juntamente com β-mercaptoetanol (2%), ao material macerado. Em seguida, o material foi incubado a 65 °C por 20 minutos. A mistura foi homogeneizada e extraída com clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1; v/v). A extração foi seguida por centrifugação a 9000 g por 15 min a 4 ° C. O sobrenadante foi coletado para novos

tubos, aos quais foi adicionado 1/3 do volume em LiCl 8M. A mistura resultante foi deixada em repouso durante 24 h a 4° C. O precipitado final foi lavado com etanol 75% e ressuspensão em 20 µl de água tratada com dietilpirocarbonato autoclavada. Foi realizado o tratamento para remoção de DNA com DNase I (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e a integridade física do RNA total foram verificadas usando NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) e gel de agarose 1,2% p/v. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por meio do kit ImProm-II (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Devido a inexistência de primers específicos para os genes aqui estudados, o desenho de primers foi realizado com base no genoma de *Arabidopsis thaliana*, da seguinte forma: as sequências das proteínas ACA11 e MCA1 foram obtidas na plataforma Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) e, a partir de cada uma, foi realizado um alinhamento (*blast*) com o proteoma de *Eucalyptus grandis*, na plataforma Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). A partir da sequência proteica com maior similaridade, foi obtida a sequência de nucleotídeos de *E. grandis* correspondente. Esta sequência foi utilizada como molde para o desenho de primers através da ferramenta Primer Blast da plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A sequência de primers para a avaliação dos níveis de expressão dos genes *ACA11* e *MCA1* se encontra na tabela 1. As reações de PCR foram realizadas usando um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) e iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Promega). A opção Fast foi utilizada na velocidade de rampa e a fluorescência foi medida a 60 ° C durante 40 ciclos. Para essa análise, o gene que codifica proteínas contendo domínio SAND (SAND) foi usado como gene de referência para normalização dos dados em todas as amostras (Martins et al., 2018). Os níveis de expressão foram calculados usando o método $2^{-\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Primers usados na análise de expressão gênica por qRT-PCR

Gene	Sequência do primer	
	Senso 5'-3'	Anti senso 5'-3'
<i>MCA1</i>	TGCGGAGGTCGTACATCTTG	TAATGAGCGGGACGAGCTTC
<i>ACA11</i>	CAGCCTGTGAGACAATGGGT	TGCCTGCAAAGGATGGCT

2.5. Análises estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As correlações de Pearson foram usadas para correlacionar o teor/conteúdo de Ca, as características morfológicas das plantas e a expressão gênica em todos os tratamentos. Para testar os pressupostos da ANOVA de normalidade de resíduos e homogeneidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e Barlett. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o software estatístico R versão 4.0.0 (R Core 2020).

3. RESULTADOS

As plantas cultivadas sob restrição hídrica apresentaram maior teor e conteúdo de Ca nas raízes. Esse aumento foi de 42,74% no teor e 73,12% no conteúdo desse nutriente nas plantas cultivadas na presença de Ca e de 124,43% no teor e 78,30% naquelas cultivadas na ausência de Ca em relação aos seus respectivos controles (Fig.1). Em contraste, o teor e conteúdo de Ca total e na parte aérea não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as plantas no tratamento sem restrição hídrica e com restrição hídrica (Fig. 1). O conteúdo e o teor de Ca na parte aérea, raiz e total foram maiores nas plantas cultivadas na presença desse nutriente (Fig.1). A eficiência de translocação (ET) reduziu com a imposição da restrição hídrica, independentemente da presença ou ausência de Ca (Fig.2).

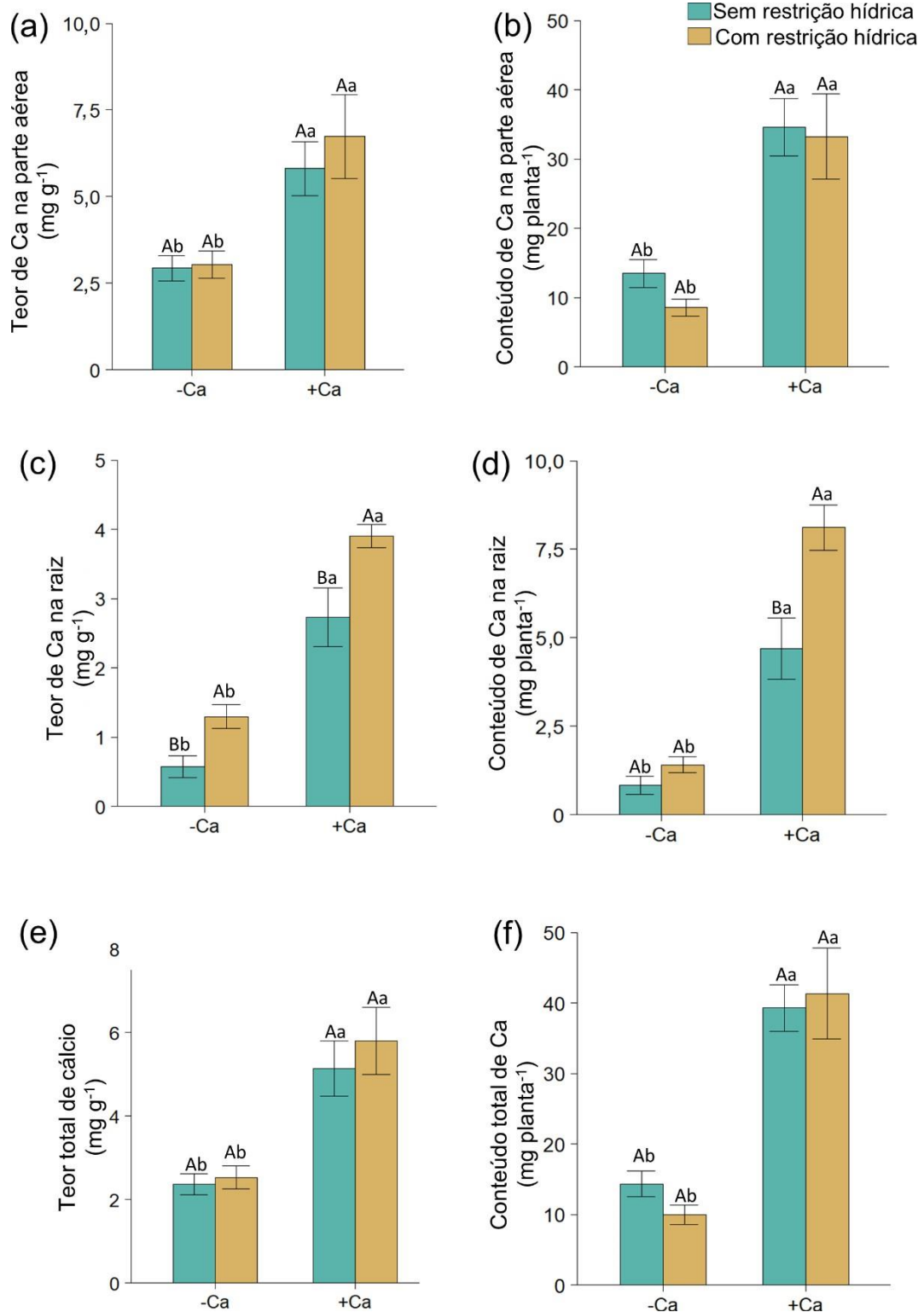


Figura 1. Teor de cálcio na parte aérea raízes e total (a,c,e) e conteúdo de Ca na parte aérea, raízes e total (b, d, f) em clone de eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução

hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

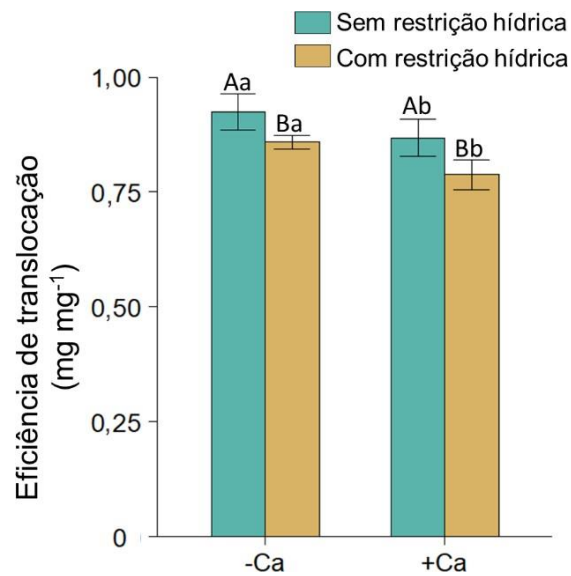


Figura 2. Eficiência de translocação de cálcio em clone de eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

A massa seca das raízes não alterou com a imposição da restrição hídrica nas plantas cultivadas na ausência de Ca. Por outro lado, a presença de Ca resultou em maior massa seca de raiz no tratamento com restrição hídrica. Tanto a área foliar (AF) quanto a massa de matéria seca da parte aérea apresentaram redução significativa sob restrição hídrica. No entanto, as plantas cultivadas na presença de Ca apresentaram maiores valores de AF e matéria seca da parte aérea quando comparadas as plantas sob omissão de Ca, independentemente da condição hídrica (Tabela 2).

A razão raiz-parte aérea foi maior nas plantas submetidas à restrição hídrica; no tratamento -Ca o aumento foi de aproximadamente 42%, enquanto no tratamento +Ca foi de aproximadamente 72%. A presença de Ca proporcionou aumento na razão raiz-parte aérea em todas as plantas quando comparadas às plantas cultivadas na omissão de Ca (Tabela 2).

As características relacionadas a morfologia da raiz, como volume de raiz, comprimento total de raiz e área de superfície das raízes não diferiram entre as plantas dos tratamentos sem restrição hídrica e com restrição hídrica, sendo os valores sempre maiores na presença de Ca. Já o diâmetro médio de raiz não diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Características morfológicas de plantas de um clone de eucalipto tolerante à seca (VM01) cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica.

	- Ca		+ Ca	
	Sem restrição hídrica	Com restrição hídrica	Sem restrição hídrica	Com restrição hídrica
Área foliar (cm ²)	824,39 ± 193,5 Ab	299,01 ± 71,17 Bb	1188,52 ± 132,53 Aa	514,83 ± 57,79 Ba
Massa seca parte aérea (g planta ⁻¹)	5,16 ± 1,13 Ab	3,09 ± 0,65 Bb	6,44 ± 1,15 Aa	5,06 ± 0,60 Ba
Massa seca raiz (g planta ⁻¹)	1,40 ± 0,14 Ab	1,17 ± 0,25 Ab	1,75 ± 0,20 Ba	2,09 ± 0,17 Aa
Razão raiz/parte aérea	0,19 ± 0,04 Bb	0,45 ± 0,09 Ab	0,49 ± 0,07 Ba	0,68 ± 0,15 Aa
Volume total de raízes (cm ³)	4,85 ± 1,01 Ab	6,33 ± 1,37 Ab	8,47 ± 1,38 Aa	9,02 ± 0,92 Aa
Comprimento total de raízes (cm)	15587,10 ± 3707,30 Ab	22925,47 ± 8490,34 Ab	26649,03 ± 4352,99 Aa	33406,12 ± 5227,57 Aa
Área superficial de raízes (cm ²)	973,64 ± 216,00 Ab	1328,31 ± 391,10 Ab	1681,66 ± 272,00 Aa	1938,10 ± 247,53 Aa
Diâmetro médio das raízes (mm)	0,20 ± 0,01 Aa	0,21 ± 0,02 Aa	0,20 ± 0,01 Aa	0,19 ± 0,01 Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio.

Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Médias ± erro padrão.

A expressão dos genes codificadores do influxo de Ca variou com a condição hídrica e suprimento de cálcio a que as plantas foram submetidas. A expressão do gene *ACA11* foi maior nas raízes das plantas cultivadas sob restrição hídrica em relação as plantas do tratamento sem restrição hídrica, independente da presença ou ausência de Ca (Fig. 3a). Por outro lado, a expressão do gene *MCA1* nas raízes foi menor com as plantas sob restrição hídrica (Fig. 3b). A expressão de ambos os genes foi maior nas raízes das plantas cultivadas na ausência de Ca (Fig.3).

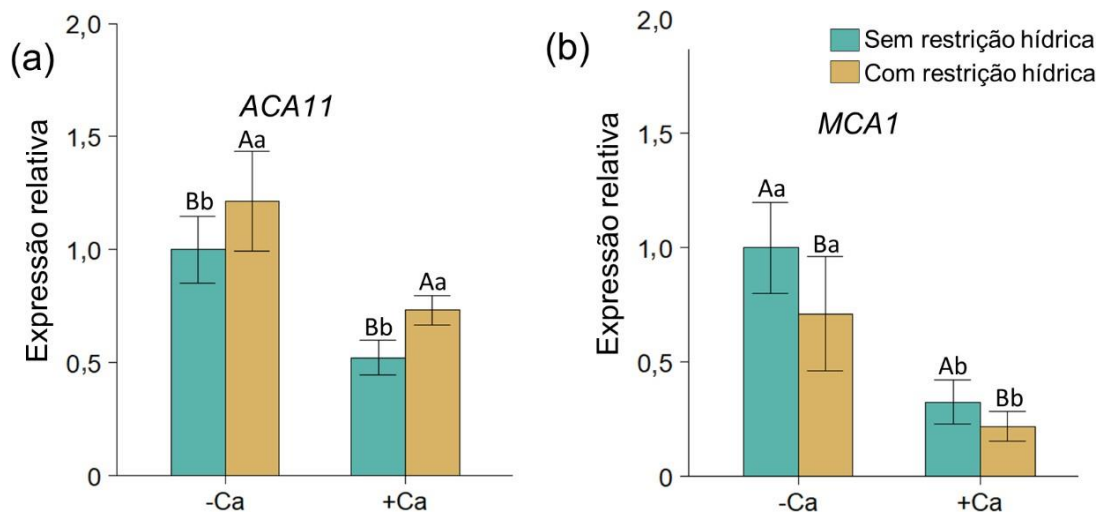


Figura 3. Expressão relativa dos genes *ACA 11*(codifica um transportador de influxo de Ca no tonoplasto) (a) e *MCA1* (codifica um transportador de influxo de Ca localizado na membrana plasmática da endoderme) (b) em raízes de um clone tolerante à seca (VM01) cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

O teor e conteúdo de Ca (Ca total, Ca na parte aérea e Ca na raiz) se correlacionaram positivamente com as características morfológicas da raiz (comprimento, área, superfície e volume). O teor e conteúdo de Ca nas raízes apresentou correlação positiva com a razão raiz/parte aérea e correlação negativa com a eficiência de translocação. Além disso, a eficiência de translocação correlacionou-se negativamente com a relação raiz/parte aérea. Os teores de Ca na planta (Ca total, Ca na parte aérea e Ca na raiz) apresentaram correlações negativas com a expressão do gene *MCA1*. Foi observada também correlação negativa entre a expressão de *MCA1* e o volume total de raízes, superfície total da raiz, comprimento de raiz e a razão raiz/parte aérea. A expressão do gene *ACA11* apresentou correlação negativa com a área foliar, conteúdo de Ca na parte aérea e total.

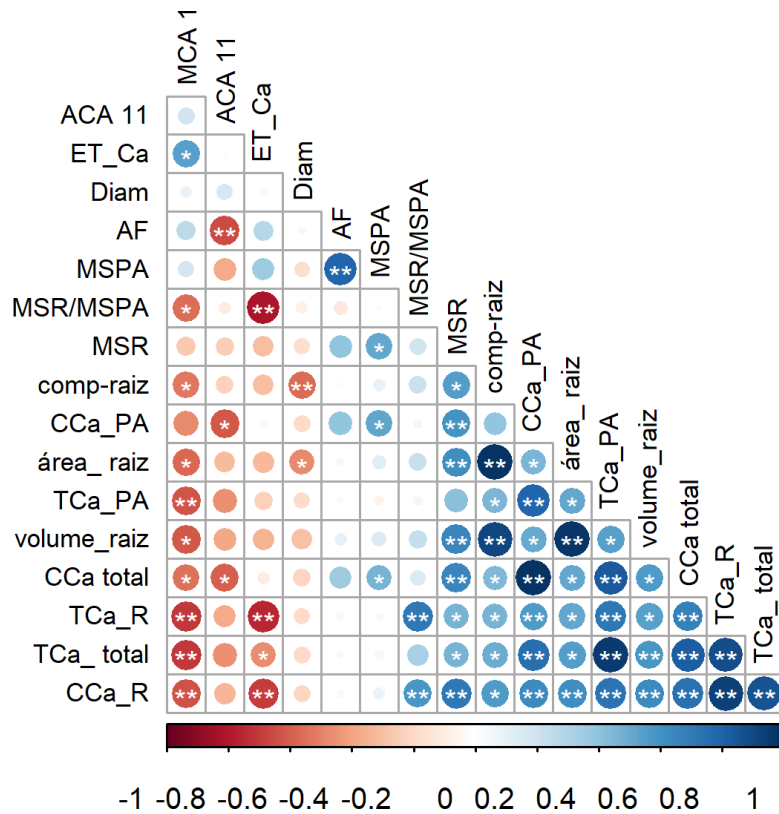


Figura 4. Matriz de correlação de Pearson entre Teor/conteúdo de cálcio, características morfológicas e transportadores de Ca. *MCA1*, transportadores de Ca na membrana plasmática da endoderme; *ACA11*, transportador de Ca do vacúolo; *ET_Ca*, eficiência de translocação de Ca; *Diam*, diâmetro médio das raízes; *AF*, área foliar, *MSPA*, massa seca da parte aérea; *MSR*, massa seca da raiz; *MSR/MSPA*, razão entre a raiz/parte aérea; *comp-raiz* comprimento radicular; *área_raiz*, área de superfície da raiz; *volume_raiz*, volume total de raiz; *TCa_PA*, teor de Ca na parte aérea, *TCa_R*, teor de Ca na raiz; *TCa_total*, teor total de Ca; *CCa_PA*, conteúdo de Ca na parte aérea; *CCa-R* conteúdo de Ca na raiz; *CCa_total*, conteúdo de Ca total. Correlações significativas ** ($p < 0,01$) e * ($p < 0,05$).

3. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o clone de eucalipto VM01, considerado tolerante à seca, apresenta maior concentração e conteúdo de Ca nas raízes sob déficit hídrico (Fig 1). Sob essa condição, o aumento da concentração de Ca nas raízes está associado, dentre outros fatores, à maior expressão do gene *ACA11* (que codifica um transportador de influxo de Ca no vacúolo) e menor expressão do gene *MCA1* (que codifica um transportador de influxo de Ca localizado na membrana plasmática da endoderme) (Fig. 3)

O Ca é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, envolvido na integridade da parede celular, estabilidade das membranas e crescimento das raízes (White and Broadley, 2003; Thor, 2019). No presente estudo as plantas cultivadas na ausência de Ca apresentaram menores concentrações desse nutriente nos tecidos, o que resultou em menor crescimento quando comparadas as plantas com adequado suprimento de Ca (Tabela 2). A ausência de Ca resultou em plantas com menores área foliar e massa seca da parte aérea. Além disso, as plantas apresentaram reduções no volume, comprimento e área superficial das raízes. Os resultados evidenciam que a concentração de Ca nos diferentes tecidos está correlacionada positivamente com as características morfológicas das plantas, indicando a importância do Ca na manutenção do crescimento vegetal (Fig.4). Por outro lado, na ausência de Ca a eficiência de translocação (ET) do nutriente foi maior comparativamente as plantas com fornecimento adequado de Ca (Fig. 2). A maior translocação de Ca para a parte aérea nas plantas cultivadas na ausência de Ca pode ser uma importante estratégia para priorizar a fotossíntese, como uma forma de compensar o menor crescimento da parte aérea e área foliar. Segundo Wang et al. (2019) o Ca desempenha papel vital na regulação da fotossíntese, estando envolvido nos processos de reação fotossintética, no movimento dos estômatos, na estabilização da clorofila e em mecanismos envolvidos na fotoproteção (Wang et al., 2019). As plantas deficientes em Ca apresentaram maior expressão dos transportadores *MCA1* e *ACA11* nas raízes em relação as

plantas com adequado suprimento desse nutriente independente das condições hídricas (Fig. 3). Esse padrão também foi observado com outros cátions bivalentes, como o Zn, em que a deficiência desse elemento favorece a expressão de transportes da membrana plasmática nas raízes (Grotz et al., 1998; Pita-Barbosa et al., 2019).

Neste estudo as plantas cultivadas sob restrição hídrica apresentaram maior concentração de Ca nas raízes e redução na eficiência de translocação, independente das concentrações externas de Ca. Em condições de déficit hídrico uma das primeiras respostas das plantas é o fechamento estomático a fim evitar a perda excessiva de água pela transpiração (Chaves et al., 2009). No entanto, a translocação de Ca para a parte aérea pela via apoplástica é dependente da transpiração, e em situações de seca ela tende a ser reduzida (da Silva et al., 2011). A menor translocação e a maior concentração de Ca nas raízes do clone VM01 durante a seca pode constituir-se numa estratégia importante para aumentar a biomassa e crescimento radicular, o que contribuiu para a maior relação raiz-parte aérea das plantas (Tabela 2). O maior desenvolvimento do sistema radicular resultando em maior biomassa e crescimento das raízes são estratégias importantes para aumentar a eficiência de absorção de água em situações de restrição hídrica (Brunner et al., 2015a). Maior proporção raiz-parte aérea além de otimizar a absorção de água minimiza sua perda por transpiração e possibilita melhor recuperação das plantas após períodos secos (Mokotedi et al., 2010; Brunner et al., 2015b). Além disso, o incremento nessa razão é uma das principais respostas de espécies de *Eucalyptus* tolerantes em condições de seca (Maseda e Fernández, 2016; Saadaoui et al., 2017). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados com *E. camaldulensis*. Hakamada et al. (2020) mostraram que plantas de um clone de eucalipto obtido do *E. camaldulensis*, cultivados em condição de campo, alocaram mais fotossimilados para a raízes como estratégia para evitar os efeitos negativos da seca. Além disso, híbridos de *E. camaldulensis* selecionados em regiões

secas tendem a apresentar maior quantidade de raízes finas e maior comprimento do sistema radicular (Pinheiro et al., 2016).

Neste trabalho as plantas de eucalipto cultivadas sob restrição hídrica apresentaram maior expressão de *ACA11* nas raízes em comparação as plantas no tratamento sem restrição hídrica, independentemente da dose de Ca (Fig.3). García Bossi et al. (2020) relataram que a expressão de *ACA11* ocorre nos tubos polínicos e nas células epidérmicas da raiz, incluindo os pêlos radiculares. De acordo com esses autores, o *ACA11* possui papel importante no crescimento dessas células. Segundo Lee et al. (2007), o *ACA11* é encontrado nos grandes vacúolos das células radiculares, os quais funcionam como grande depósito de armazenamento de Ca. Devido à baixa mobilidade do Ca nos tecidos vegetais, é provável que uma grande proporção desse elemento seja sequestrada no vacúolo das células radiculares (Maathuis, 2009; Pinto and Ferreira, 2015). Nossos resultados sugerem que o aumento na concentração de Ca nas raízes das plantas do clone VM01 sob seca está associado a maior expressão do gene *ACA11* e, conseqüentemente, maior influxo e acúmulo desse nutriente nos vacúolos das células radiculares (Fig.5).

Por outro lado, foi observado que o tratamento com restrição hídrica ocasionou redução na expressão do gene *MCA1* nas raízes, em relação às plantas com adequado suprimento de água (Fig. 3). Em estudos realizados com *Arabidopsis thaliana*, os autores relataram que o gene *MCA1* é expresso nas membranas plasmáticas da endoderme e no estelo das raízes primárias. De acordo com esses autores, devido a esse padrão de expressão espacial, a proteína MCA1 está envolvida na captação e no transporte de Ca para o xilema através da via simplástica nas células endodérmicas e vasculares (Nakagawa et al., 2007; Yamanaka et al., 2010). A contribuição relativa das vias apoplásticas e simplásticas no movimento do Ca até o xilema é desconhecida e parece depender da espécie (White, 2000; White and Broadley, 2003; Cholewa and Peterson, 2004; González-Fontes et al., 2017). No entanto, a presença da estria de Caspary

ao redor da endoderme, restringe o movimento do Ca pela via apoplástica. Assim, o movimento de Ca nas células da endoderme com presença da banda caspariana ocorre necessariamente através da via simplástica (White, 2001; White and Broadley, 2003). Nossos resultados sugerem que a menor expressão de *MCA1* nas raízes do clone VM01 sob condições de restrição hídrica diminui o influxo na endoderme e a entrega de Ca para o xilema (Fig. 5). Esse fato foi confirmado pelo aumento da concentração de Ca nas raízes das plantas submetidas à seca e sua correlação negativa com a expressão de *MCA1*.

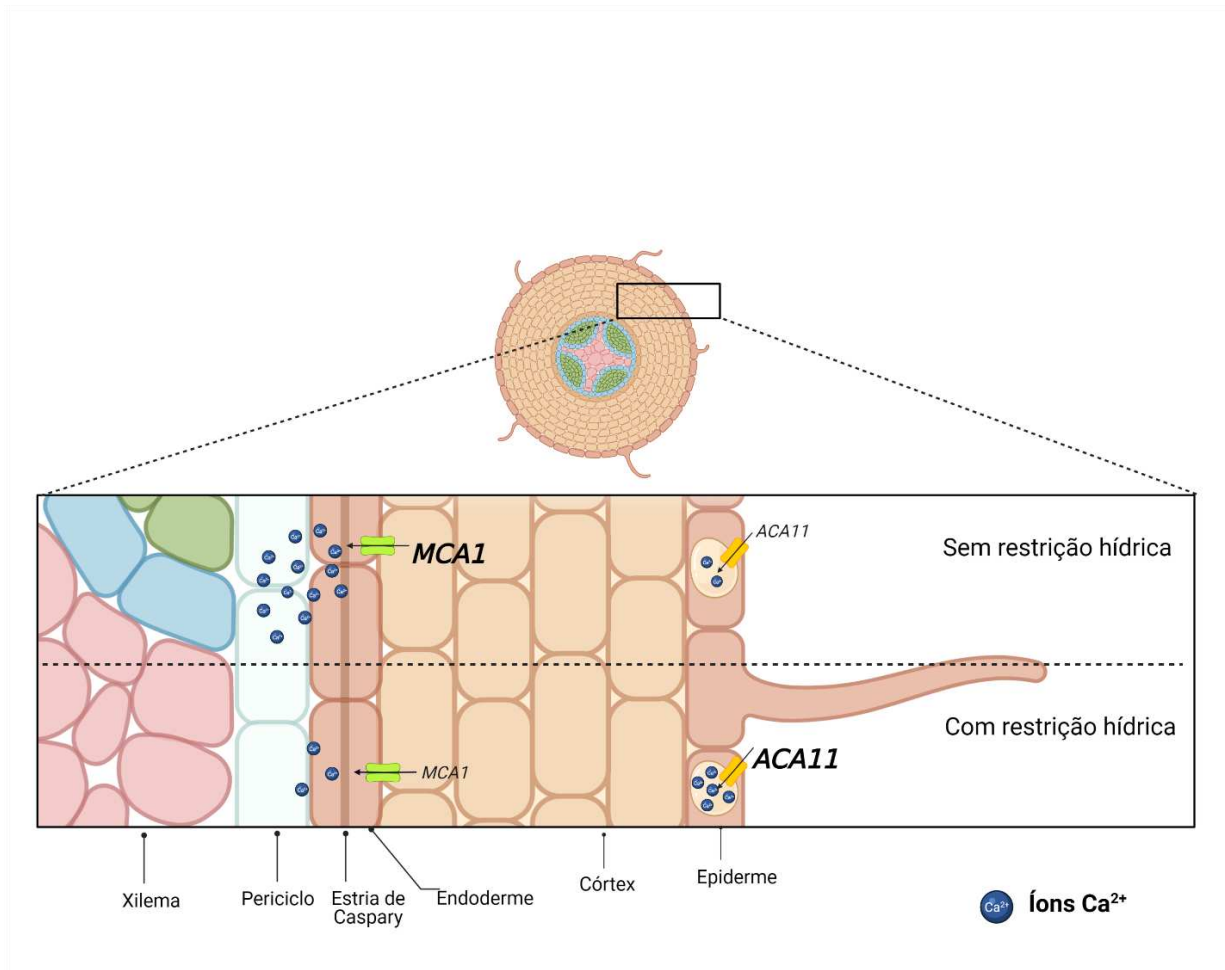


Figura 5. Modelo hipotético de como ocorre a expressão dos genes *ACA 11*(codifica um transportador de influxo de Ca no tonoplasto) e *MCA1* (codifica um transportador de influxo de Ca localizado na membrana plasmática da endoderme) em raízes de um clone de eucalipto tolerante à seca (VM01) cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de restrição hídrica. As alterações no tamanho da fonte do texto representam variação na expressão dos genes *ACA1* e *MCA1* (maior fonte maior expressão). A imagem foi feita com [BioRender.com](https://www.biorender.com).

5. CONCLUSÕES

Este estudo indicou que a restrição hídrica promove o aumento de Ca nas raízes do clone de eucalipto VM01 e que essa característica aumenta a tolerância à seca desse material genético. Os resultados mostraram que a maior concentração de Ca nas raízes está associada a menor expressão do gene *MCA1* e maior expressão do gene *ACA11*. O aumento da concentração de Ca nas raízes em condição de restrição hídrica favorece o aumento da massa seca das raízes e a relação raiz/parte aérea do clone VM01. O maior investimento do clone VM01 no sistema radicular em condições de déficit hídrico é uma importante estratégia para otimizar a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, aumentar a tolerância desse clone à seca.

REFERÊNCIAS

- Allen CD, Breshears David D, McDowell Nate G, Allen C., Breshears D D, McDowell N G. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere*. 2015;6:1-55. <https://doi.org/10.1890/ES15-00203.1>
- Anderegg WRL, Kane JM, Anderegg LDL. Consequences of widespread tree mortality triggered by drought and temperature stress. *Nat Clim Chang* 2012 31. 2012;3:30-6. <https://doi.org/10.1038/nclimate1635>
- Anjum S, Xie X, Wang L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African J Agric Res*. 2011;6:2026-32. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Barros Filho NF de. Discriminação isotópica do ¹³C e nutrição com cálcio e boro em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico [tese]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2014.
- Barros PR de. Respostas morfofisiológicas iniciais de clones de eucalipto ao estresse osmótico em sistema hidropônico [dissertação]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2018.
- Brunner I, Herzog C, Dawes MA, Arend M, Sperisen C. How tree roots respond to drought. *Front Plant Sci*. 2015a;6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>
- Caione G, Lange A, Schoninger EL. Crescimento de mudas de *Schizolobium amazonicum* (Huber ex Ducke) em substrato fertilizado com nitrogênio, fósforo e potássio. *Sci For Sci*. 2012;40:213-21
- Campoe OC, Alvares CA, Carneiro RL, Binkley D, Ryan MG, Hubbard RM, Stahl J, Moreira G, Moraes LF, Stape JL. Climate and genotype influences on carbon fluxes and partitioning in Eucalyptus plantations. *For Ecol Manage*. 2020;475:118445. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2020.118445>
- Cao X, Chen C, Zhang D, Shu B, Xiao J, Xia R. Influence of nutrient deficiency on root architecture and root hair morphology of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under sand culture. *Sci Hort (Amsterdam)*. 2013;162:100-5. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.034>
- Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Report* 1993 112. 1993;11:113-6. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot*. 2009;103:551-60. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen CT, Lee CL, Yeh DM. Effects of Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Calcium, or Magnesium Deficiency on Growth and Photosynthesis of *Eustoma*. *HortScience*. 2018;53:795-8. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12947-18>

- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL, Lens F, Maherali H, Martínez-Vilalta J, Mayr S, Mencuccini M, Mitchell PJ, Nardini A, Pittermann J, Pratt RB, Sperry JS, Westoby M, Wright IJ, Zanne AE. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nat* 2012 4917426. 2012;491:752-5. <https://doi.org/10.1038/nature11688>
- Cholewa E, Peterson CA. Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots. *Plant Physiol.* 2004;134:1793-802. <https://doi.org/10.1104/PP.103.035287>
- Christina M, Nouvellon Y, Laclau JP, Stape JL, Bouillet JP, Lambais GR, le Maire G. Importance of deep water uptake in tropical eucalypt forest. *Funct Ecol.* 2017;31:509-19. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12727>
- Clark RB. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. *J Plant Nutr.* 1982;5:1039-57. <https://doi.org/10.1080/01904168209363037>
- Costa e Silva F, Shvaleva A, Maroco JP, Almeida MH, Chaves MM, Pereira JS. Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. *Tree Physiol.* 2004;24:1165-72. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.10.1165>
- Demarty M, Morvan C, Thellier M. Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* 1984;7:441-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1984.tb01434.x>
- Fernandes ET, Cairo PAR, Novaes AB De. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica Physiological responses of eucalyptus clones grown in a greenhouse under water deficit. *Ciência Florest.* 2015;45:29-34. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120152>
- Forde B, Lorenzo H. The nutritional control of root development. *Interact Root Environ An Integr Approach.* 2002:51-68. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0566-1_6
- García Bossi J, Kumar K, Barberini ML, Domínguez GD, Rondón Guerrero YDC, Marino-Buslje C, Obertello M, Muschietti JP, Estevez JM. The role of P-type IIA and P-type IIB Ca²⁺-ATPases in plant development and growth. *J Exp Bot.* 2020;71:1239-48. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ521>
- Giehl RFH, von Wirén N. Root Nutrient Foraging. *Plant Physiol.* 2014;166:509-17. <https://doi.org/10.1104/PP.114.245225>
- González-Fontes A, Navarro-Gochicoa MT, Ceacero CJ, Herrera-Rodríguez MB, Camacho-Cristóbal JJ, Rexach J. Understanding calcium transport and signaling, and its use efficiency in vascular plants. Elsevier Inc.; 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00009-0>
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N. Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiol.* 2013;163:161-79. <https://doi.org/10.1104/PP.113.218453>
- Hakamada RE, Hubbard RM, Moreira GG, Stape JL, Campoe O, Ferraz SF de B. Influence of

- stand density on growth and water use efficiency in Eucalyptus clones. For *Ecol Manage.* 2020;466:118125. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2020.118125>
- Hamanishi ET, Campbell MM. Genome-wide responses to drought in forest trees. For *An Int J For Res.* 2011;84:273-83. <https://doi.org/10.1093/FORESTRY/CPR012>
- Hartmann H. Will a 385 million year-struggle for light become a struggle for water and for carbon? – How trees may cope with more frequent climate change-type drought events. *Glob Chang Biol.* 2011;17:642-55. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2486.2010.02248.X>
- Johnson CM, Ulrich A. 2. Analytical methods for use in plant analysis. *Bull Calif Agric Exp Stn.* 1959
- Kumar A, Singh UM, Manohar M, Gaur VS. Calcium transport from source to sink: understanding the mechanism(s) of acquisition, translocation, and accumulation for crop biofortification. *Acta Physiol Plant.* 2015;37:1-14. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1722-6>
- Kuronuma T, Watanabe H. Search for Candidate Genes Causing the Excessive Ca Accumulation in Roots of Tipburn-Damaged Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) Cultivars. *Agric* 2021, Vol 11, Page 254. 2021;11:254. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11030254>
- Lee SM, Kim HS, Han HJ, Moon BC, Kim CY, Harper JF, Chung WS. Identification of a calmodulin-regulated autoinhibited Ca²⁺-ATPase (ACA11) that is localized to vacuole membranes in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 2007;581:3943-9. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2007.07.023>
- Li B, McKeand SE, Allen HL. Genetic Variation in Nitrogen Use Efficiency of Loblolly Pine Seedlings. 1991
- Liu Y, Riaz M, Yan L, Zeng Y, Cuncang J. Boron and calcium deficiency disturbing the growth of trifoliolate rootstock seedlings (*Poncirus trifoliolate* L.) by changing root architecture and cell wall. *Plant Physiol Biochem.* 2019;144:345-54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.007>
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Locatelli M, Barros NF, Neves JCL, Novais RF. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *Rev Árvore.* 1984;8:53-69.
- Maathuis FJ. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12:250-8. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2009.04.003>
- Markesteyn L, Poorter L. Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *J Ecol.* 2009;97:311-25. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2745.2008.01466.X>

- Marschner P. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3. ed. 2012
- Martins GS, Freitas NC, Máximo WPF, Paiva LV. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *J Plant Physiol.* 2018;229:122-31. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.007>
- Michel BE, Kaufmann MR. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol.* 1973;51:914-6. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- Mokotedi MEO, Watt MP, Pammenter NW. Analysis of differences in field performance of vegetatively and seed-propagated eucalyptus varieties ii: Vertical uprooting resistance. *South For.* 2010;72:31-6. <https://doi.org/10.2989/20702620.2010.481131>
- Müller C, Hodecker BER, De Barros NF, Merchant A. A physiological approach for pre-selection of eucalyptus clones resistant to drought. *IForest.* 2020;13:16-23. <https://doi.org/10.3832/ifor3185-012>
- Müller C, Hodecker BER, Merchant A, Barros NF de, Müller C, Hodecker BER, Merchant A, Barros NF de. Nutritional Efficiency of Eucalyptus Clones Under Water Stress. *Rev Bras Ciência Do Solo.* 2017;41. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160528>
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H. Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3639-44. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607703104>
- Peiter E. The plant vacuole: Emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium.* 2011;50:120-8. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2011.02.002>
- Pinheiro RC, de Deus JC, Nouvellon Y, Campoe OC, Stape JL, Aló LL, Guerrini IA, Jourdan C, Laclau JP. A fast exploration of very deep soil layers by Eucalyptus seedlings and clones in Brazil. *For Ecol Manage.* 2016;366:143-52. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2016.02.012>
- Pinto E, Ferreira IMPLVO. Cation transporters/channels in plants: Tools for nutrient biofortification. *J Plant Physiol.* 2015;179:64-82. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2015.02.010>
- Pinto SI do C, Neto AEF, Neves JCL, Faquin V, Moretti B da S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivadas em solução nutritiva. *Rev Bras Ciência Do Solo.* 2011; 35:523-533
- Pittman JK. Vacuolar Ca²⁺ uptake. *Cell Calcium.* 2011;50:139-46. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2011.01.004>
- Santos EA, Almeida A-AF de, Ahnert D, Branco MC da S, Valle RR, Baligar VC. Diallel Analysis and Growth Parameters as Selection Tools for Drought Tolerance in Young *Theobroma cacao* Plants. *PLoS One.* 2016;11:e0160647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160647>

- Santos EF, Mateus NS, Rosário MO, Garcez TB, Mazzafera P, Lavres J. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol Plant*. 2021;172:552-63. <https://doi.org/10.1111/PPL.13228>
- Schönknecht G. Calcium Signals from the Vacuole. *Plants* 2013, Vol 2, Pages 589-614. 2013;2:589-614. <https://doi.org/10.3390/PLANTS2040589>
- Sharma A, Shankhdhar D, Shankhdhar S. The role of calcium in plant signal transduction under macronutrient deficiency stress. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00010-7>
- da Silva E, Nogueira R, da Silva M, de Albuquerque M. Drought stress and plant nutrition. *Plant Stress*. 2011;5:32-41
- Souza NF. Genótipos de eucalipto tolerantes à seca apresentam maior capacidade de absorção e eficiência de uso de cálcio? [tese]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2019.
- Thor K. Calcium—Nutrient and Messenger. *Front Plant Sci*. 2019a;10:440. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>
- Valdés AE, Irar S, Majada JP, Rodríguez A, Fernández B, Pagès M. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. *J Proteomics*. 2013a;79:263-76. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.019>
- Wang Q, Yang S, Wan S, Li X. The significance of calcium in photosynthesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1353. <https://doi.org/10.3390/ijms20061353>
- White PJ. The pathways of calcium movement to the xylem. *J Exp Bot*. 2001;52:891-9. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.358.891>
- White PJ. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2000;1465:171-89. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00137-1)
- White PJ, Broadley MR. Calcium in plants. *Ann Bot*. 2003;92:487-511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Yamanaka T, Nakagawa Y, Mori K, Nakano M, Imamura T, Kataoka H, Terashima A, Iida K, Kojima I, Katagiri T, Shinozaki K, Iida H. MCA1 and MCA2 That Mediate Ca²⁺ Uptake Have Distinct and Overlapping Roles in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2010b;152:1284. <https://doi.org/10.1104/PP.109.147371>

CAPÍTULO 2

O CÁLCIO REDUZ OS DANOS E MANTÉM A ESTABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA EM PLANTAS DE EUCALIPTO

RESUMO

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **O cálcio reduz os danos e mantém a estabilidade da membrana celular sob condições de restrição hídrica em plantas de eucalipto.** Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Samuel Vasconcelos Valadares

Devido as mudanças climáticas atuais, períodos de seca estão cada vez mais frequentes. A seca é o principal estresse abiótico que afeta o crescimento e a produtividade das florestas plantadas. O cálcio (Ca) possui papel importante na mitigação dos efeitos da restrição hídrica nas plantas. No entanto, em plantas de eucalipto sob seca os efeitos desse nutriente na redução dos danos causados pela restrição hídrica precisam ser estudados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da restrição hídrica e do Ca nas respostas fisiológicas em um clone de eucalipto tolerante à seca. Para isso, plantas do clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*), considerado tolerante à seca, foram cultivadas em sistema hidropônico e submetidas à restrição hídrica pelo uso de polietilenoglicol 6000. Os resultados obtidos mostraram que as plantas cultivadas na presença de Ca sob restrição hídrica apresentaram maior hidratação, menores danos oxidativos e maior atividade de enzima antioxidante. Portanto, a estratégia de manejo dos plantios de eucalipto deve buscar melhorar a nutrição com Ca a fim de reduzir danos causados pela seca nessa cultura.

ABSTRACT

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Calcium reduces damage and maintains cell membrane stability in eucalyptus plants under water-restricted conditions.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Alice Pita Barbosa and Samuel Vasconcelos Valadares

Drought periods are increasing and becoming more frequent due to current climate changes. Drought is the main abiotic stress that affects growth and productivity of planted forests. Calcium (Ca) plays an important role in mitigating the effects of water restriction on plants. However, the effects of this nutrient in reducing the damage caused by water restriction in eucalyptus plants still need to be studied. The objective of this study was to evaluate the effect of water restriction and Ca on physiological responses in a drought-tolerant eucalyptus clone. For this, plants of the drought-tolerant clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*) were grown in a hydroponic system and subjected to water restriction using polyethylene glycol 6000. The results showed that plants grown in the presence of Ca under water restriction have greater hydration, less oxidative damage and greater antioxidant enzyme activity. Therefore, management strategies should seek to improve nutrition with Ca in order to reduce damage caused by drought in eucalyptus plantations.

1. INTRODUÇÃO

Os plantios de eucalipto para fins comerciais cobrem uma área de aproximadamente 20 milhões de hectares distribuídos em mais de 90 países (ENCE, 2009; Ferreira et al., 2019). A maioria das espécies desse gênero se destaca devido ao seu rápido crescimento e alta produtividade, além da grande variedade de produtos gerados pelo seu cultivo, como madeira, celulose, óleos e carvão (Payn et al., 2015; Carle et al., 2020).

Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico é o que mais afeta a produtividade e a sobrevivência das florestas em todo o mundo (Allen et al., 2010; Bennett et al., 2015; Duke et al., 2017). O incremento da temperatura do ar e dos níveis atmosféricos de CO₂ tende a acelerar as mudanças climáticas nos próximos anos, resultando no aumento da frequência e da intensidade dos períodos de seca e maior mortalidade de árvores em diversas áreas do globo (IPCC, 2019).

A privação de água pode desencadear fortes modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, reduzindo a produtividade das culturas (Jimenez et al., 2013; Zheng et al., 2017). Em plantas sob déficit hídrico, as taxas fotossintéticas são reduzidas, devido ao rápido fechamento estomático, o que resulta em menor disponibilidade interna de CO₂, acúmulo de elétrons nas membranas dos tilacóides, incremento nos níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (Chaves et al., 2009; Anjum et al., 2011; Silva et al., 2015; Ilyas et al., 2020). Além disso, a baixa hidratação dos tecidos ocasiona a redução da produtividade e até mesmo a morte das plantas (Stape et al., 2010; Rivas et al., 2016; Caser et al., 2017).

O cálcio (Ca) é um nutriente mineral importante no crescimento, na produtividade e na mitigação dos efeitos adversos causados pela seca nas plantas (Lundqvist et al., 2017; M. Naeem et al., 2017; Khushboo et al., 2018; Rezayian et al., 2018; Huang et al., 2019; Naeem et al., 2020; Rezayian et al., 2020; Leng et al., 2020; Abbas et al., 2021). O Ca, funciona ainda,

como mensageiro secundário de respostas aos estresses abióticos nas plantas. A ligação do Ca com a calmodulina está envolvida na detecção, transmissão, resposta e expressão de sinais de estresse nas plantas e no aumento da tolerância à seca (An et al., 2014; Thor, 2019). O Ca também apresenta grande importância estrutural na parede e membranas celulares, além de atuar em diferentes processos de sinalização celular (Thor, 2019).

O fornecimento de Ca confere maior tolerância ao estresse hídrico, minimiza a peroxidação lipídica das membranas e aumenta as respostas antioxidantes, protegendo as plantas de danos oxidativos induzidos pelo estresse (Upadhyaya et al., 2011; Wu et al., 2012; Leng et al., 2020). Além disso, o Ca está envolvido na melhoria do status hídrico das plantas por meio da síntese de substâncias de ajuste osmótico e pelo aumento da eficiência de uso da água (Wang et al., 2014; Kang et al., 2017). Esse nutriente possui papel importante nas múltiplas vias fotossintéticas e na regulação do movimento estomático (Wang et al., 2019). Embora diversos estudos tenham comprovado os efeitos positivos do Ca na tolerância das plantas a diferentes estresses, até o momento são escassos os trabalhos que relacionam o efeito desse macronutriente e a mitigação da seca em eucaliptos.

A compreensão do potencial do Ca na mitigação dos efeitos do déficit hídrico em plantas de eucalipto é essencial para possibilitar a implantação e manejo dessa cultura em regiões de baixa disponibilidade hídrica. Além disso, essas informações são importantes para o desenvolvimento de materiais genéticos mais tolerantes ao estresse hídrico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial do Ca na mitigação dos efeitos da seca sobre a processos fisiológicos chaves, como a fotossíntese, o status hídrico e a homeostase oxidativa em um clone de eucalipto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. *Condições de crescimento das plantas e desenho experimental*

Foram utilizadas mudas de três meses de idade (~ 30 cm de comprimento) do clone de eucalipto VM01 (*Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus camaldulensis*), devido sua grande importância econômica e por apresentar alta tolerância ao déficit hídrico (Fernandes et al., 2015; Martins et al., 2018; Santos et al., 2021). As mudas foram aclimatadas em casa de vegetação, em vasos de polietileno (3 L) contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1982), adaptada por Locatelli et al. (1984), sob aeração constante e pH próximo a 6. Na fase inicial do período de adaptação a solução de cultivo teve força iônica equivalente a 50% da solução padrão. Gradualmente, a força iônica da solução foi elevada até 100% da solução padrão. As trocas de solução foram realizadas semanalmente (Pinto et al., 2011).

Após 15 dias de aclimação, as plantas foram submetidas aos tratamentos com presença ou ausência de Ca durante 12 dias. Após esse período, a restrição hídrica foi imposta pelo uso de polietilenoglicol (PEG 6000). Foi adicionada a dose 235g de PEG 6000 de maneira gradativa em um intervalo de dez dias até que o potencial hídrico da solução atingisse – 0,65 MPa (Michel e Kaufmann, 1973). Seis dias após a solução atingir o potencial hídrico da solução de – 0,65 MPa, ou seja, 16 dias após o início da imposição da restrição hídrica, foram realizadas as coletas. A solução nutritiva para reposição dos nutrientes foi trocada a cada seis dias. O experimento e as análises posteriores foram realizados considerando o desenho experimental de blocos casualizados, com cinco repetições em arranjo fatorial 2 x 2: presença ou ausência de restrição hídrica x presença ou ausência de Ca.

1.2. *Status hídrico e fotossíntese*

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado na antemanhã (entre 4 e 5h da manhã), em folhas completamente expandidas, usando câmara de pressão do tipo ‘Scholander’ (PMS-1000; PMS Instruments, Albany, NY, EUA). A taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinados utilizando-se um analisador de gás por infravermelho (IRGA LCrop-SD). As medições foram realizadas no período da manhã em folhas completamente expandidas do terceiro nó, entre 08:00 e 12:30 h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 .

Os pigmentos fotossint\u00e9ticos, clorofilas a e b e de carotenoides, foram quantificados ap\u00f3s extra\u00e7\u00e3o em metanol 100% de acordo com o m\u00e9todo de Lichtenthaler (1987). A absor\u00e7\u00e3o foi medida a 653 nm, 666 nm e 470 nm em espectr\u00f4metro (UV/Vis\u00edvel Multiskan GO®) e o c\u00e1lculo realizado da seguinte forma:

$$C_a (\mu\text{g mg}^{-1} \text{MF}) = 16,72A_{666} - 9,28A_{653}$$

$$C_b (\mu\text{g mg}^{-1} \text{MF}) = 34,09A_{653} - 15,28A_{666}$$

$$\text{Carotenoides} (\mu\text{g mg}^{-1} \text{MF}) = 1000A_{470} - 1,63C_a - 104,96C_b / 221$$

1.3. *Estresse oxidativo*

O teor de per\u00f3xido de hidrog\u00e9nio (H_2O_2) foi determinado de acordo com o m\u00e9todo descrito por Velikova et al. (2000). A mistura de rea\u00e7\u00e3o continha 1500 μL de TCA 0.1%, 2,5 mM de K_2HPO_4 pH 7 e 0,5M de KI. As leituras de absorv\u00eancia foram realizadas a 390 nm em

espectrômetro (UV/Visível Multiskan GO®), sendo o teor de peróxido calculado usando a curva padrão de peróxido de hidrogênio.

A peroxidação lipídica foi estimada por meio da análise do acúmulo de aldeído malônico (MDA) (Heath e Packer, 1968). Amostras de folhas liofilizadas (35 mg) foram homogeneizadas com 1.5 mL de ácido tricloacético 0, 1%. O extrato foi centrifugado por 15 min a 12.000 g, 4 °C. Foram coletados 500 µL do sobrenadante e adicionado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, preparado em TCA 20%. A mistura foi incubada a 95 ° C durante 30 min e arrefecida em gelo durante 10 min. A concentração de MDA foi determinada pela leitura das absorvâncias do produto final a 532 e 600 nm em espectrômetro (UV/Visível Multiskan GO®). O conteúdo de MDA foi calculado usando a equação:

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{ MF)} = (A_{532} - A_{600}) / (\xi * b), \text{ em que } \xi = \text{coeficiente de extinção molar} = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

1.4. Extravasamento de eletrólitos

O extravasamento de eletrólitos foi determinado de acordo com o método descrito por Sairam e Srivastava (2002). Dez discos foliares de 1,1 cm de diâmetro foram coletados e lavados com água deionizada para remover eletrólitos aderidos à superfície e, em seguida, imersos em 20 mL de água deionizada à temperatura ambiente. Após 24 h foi medida a condutividade elétrica inicial (EC1). Em seguida, as amostras foram submetidas à temperatura de 90 ° C, por 2 h, em estufa de secagem, e após resfriamento foi aferida a condutividade final (EC2). O extravasamento de eletrólitos (EL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{EL} = (\text{EC1} / \text{EC2}) \times 100.$$

1.5. *Determinação da atividade de enzimas antioxidantes*

Para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), amostras de folhas liofilizadas (35 mg) foram homogeneizadas com fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTA 0,1mM 180 mM, PMSF 1mM e 1% e PVPP 1% (p/v) (Ribeiro et al., 2012). Os homogenatos foram filtrados e centrifugados a 12.000 g por 15 min a 4 ° C, e os sobrenadantes foram utilizados com extrato bruto da enzima. A atividade de SOD foi determinada medindo o potencial da enzima em inibir a redução fotoquímica do nitro azul de tetrazólio (NBT), como descrito por Giannopolitis and Ries (1977). Para a determinação da atividade de CAT foram adicionados tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM ao extrato enzimático (Ribeiro et al., 2012). A atividade de CAT foi estimada pela mudança de absorvância durante o primeiro minuto de reação a 30°C usando o seguinte coeficiente de extinção molar: (240 nm, $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

1.6. *Análises estatísticas*

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Para testar os pressupostos da ANOVA de normalidade de resíduos e homogeneidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e Barlett. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o software estatístico R versão 4.0.0 (R Core 2020).

3. RESULTADOS

As plantas do clone de eucalipto VM01 cultivados em solução hidropônica sob restrição hídrica apresentaram folhas com sintomas de seca como murcha, aspecto retorcido e ressecado e bordas amareladas. No entanto, as plantas que receberam suplementação com Ca apresentaram sintomas mais leves no tratamento com restrição hídrica (Fig. 1)

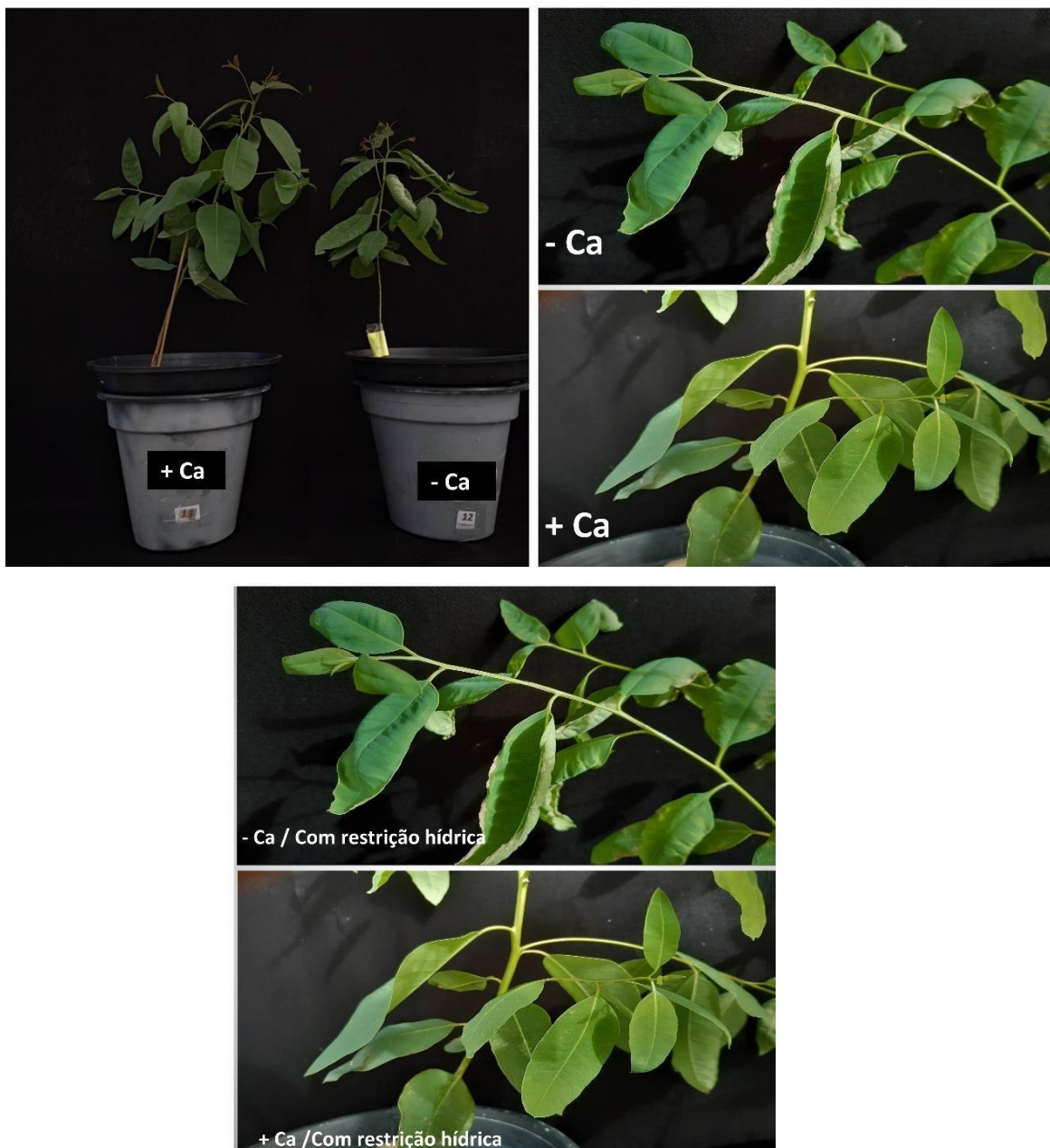


Figura 1. Sintomas em plantas de em clone eucalipto tolerante à seca (VM01) cultivado em solução hidropônica sob restrição hídrica na presença ou ausência de Ca.

Os valores do potencial hídrico foliar (Ψ_w) foram similares nas plantas sem restrição hídrica com e sem Ca, isto é, próximo a $-0,30$ MPa. A restrição hídrica reduziu significativamente o Ψ_w em comparação com as plantas controle (sem restrição hídrica). No entanto, no tratamento com restrição hídrica e ausência de Ca o Ψ_w foi mais negativo ($-0,82$ MPa), ao passo que nas plantas cultivadas na presença de Ca o Ψ_w foi maior ($-0,68$ MPa) (Fig.2).

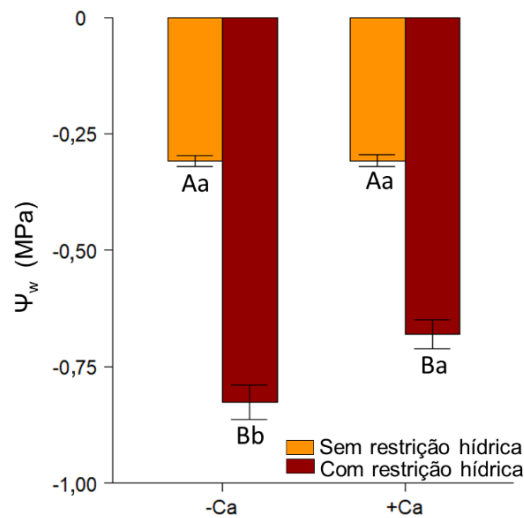


Figura 2. Potencial hídrico foliar (Ψ_w) na antemãnhã em clone eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

O desempenho fotossintético foi afetado negativamente nas plantas sob restrição hídrica. O estresse pela seca levou a diminuições de aproximadamente 23% na taxa de fotossíntese líquida (A) na ausência de Ca e em torno de 9% na presença de Ca em relação aos seus respectivos controles (Fig. 3a). A taxa de transpiração (E) reduziu 61% na ausência de Ca e 20% na presença de Ca nas plantas cultivadas sob restrição hídrica em relação aos seus

respectivos controles (Fig. 3b). A imposição da restrição hídrica promoveu decréscimos nos valores de condutância estomática (g_s) e na razão C_i/C_a em todas as plantas submetidas nessa condição. No tratamento sem restrição hídrica (Controle) todas as plantas apresentaram valores semelhantes de A , g_s , E e razão C_i/C_a (Fig. 3)

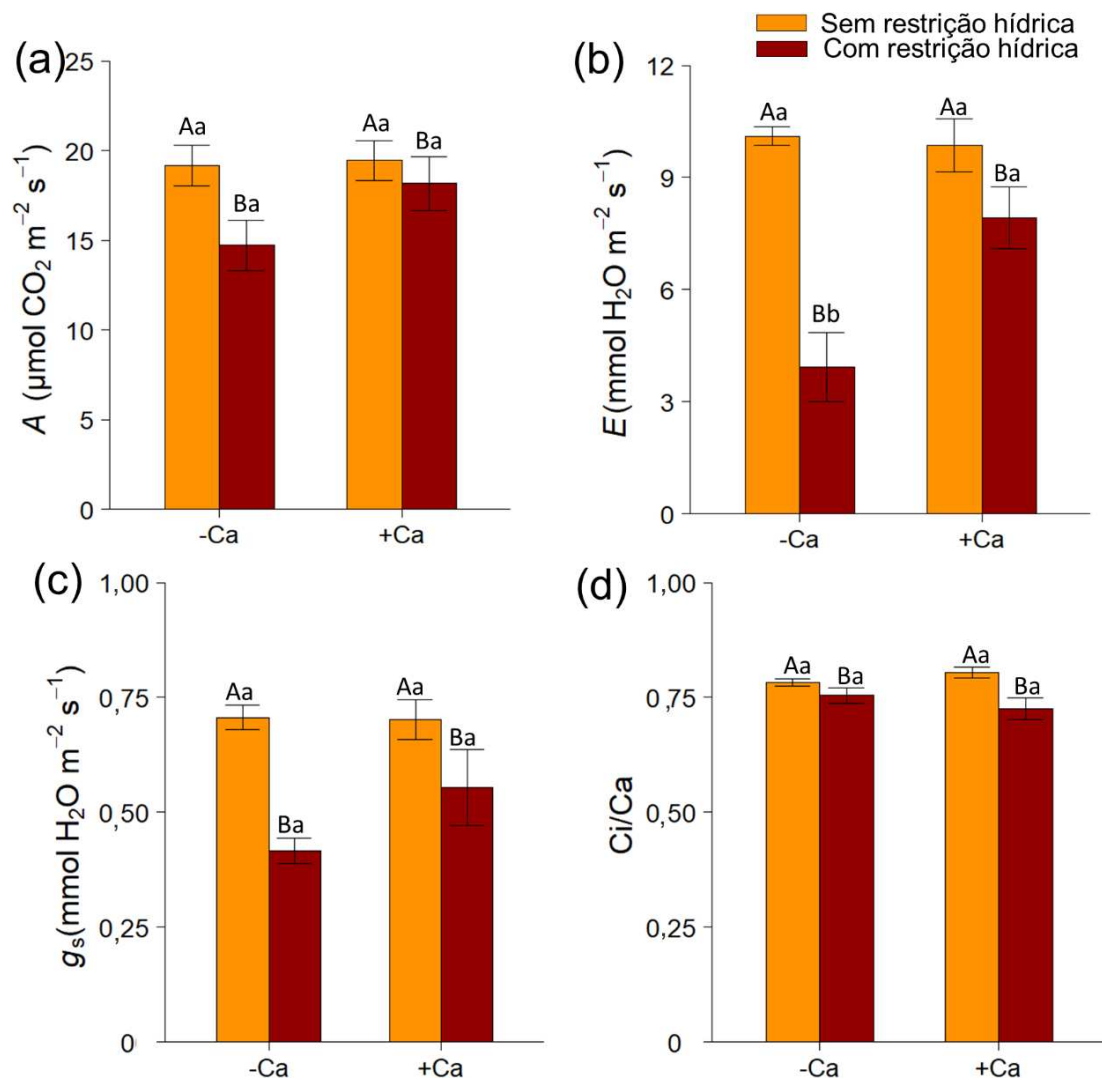


Figura 3. (a) Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A), (b) Taxa de transpiração (E), (c) condutância estomática (g_s) e (d) razão entre a concentração interna e externa de CO_2 em clone eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

O conteúdo de clorofila a (C_a) reduziu 35% no tratamento com restrição hídrica apenas na ausência de Ca (Fig. 4a). Houve decréscimo no conteúdo de clorofila b (C_b) em todas as

plantas submetidas a restrição hídrica. Na ausência de Ca essa redução foi de 32,8 %, ao passo que na presença de Ca o decréscimo foi de 6,16% quando comparado com as plantas controle dentro da mesma dose de Ca (Fig. 4b). O conteúdo de carotenoides não diferiu entre os tratamentos (Fig. 4c). Todas as plantas na ausência de restrição hídrica não apresentaram diferenças entre os pigmentos fotossintéticos em relação as doses de Ca (Fig. 4)

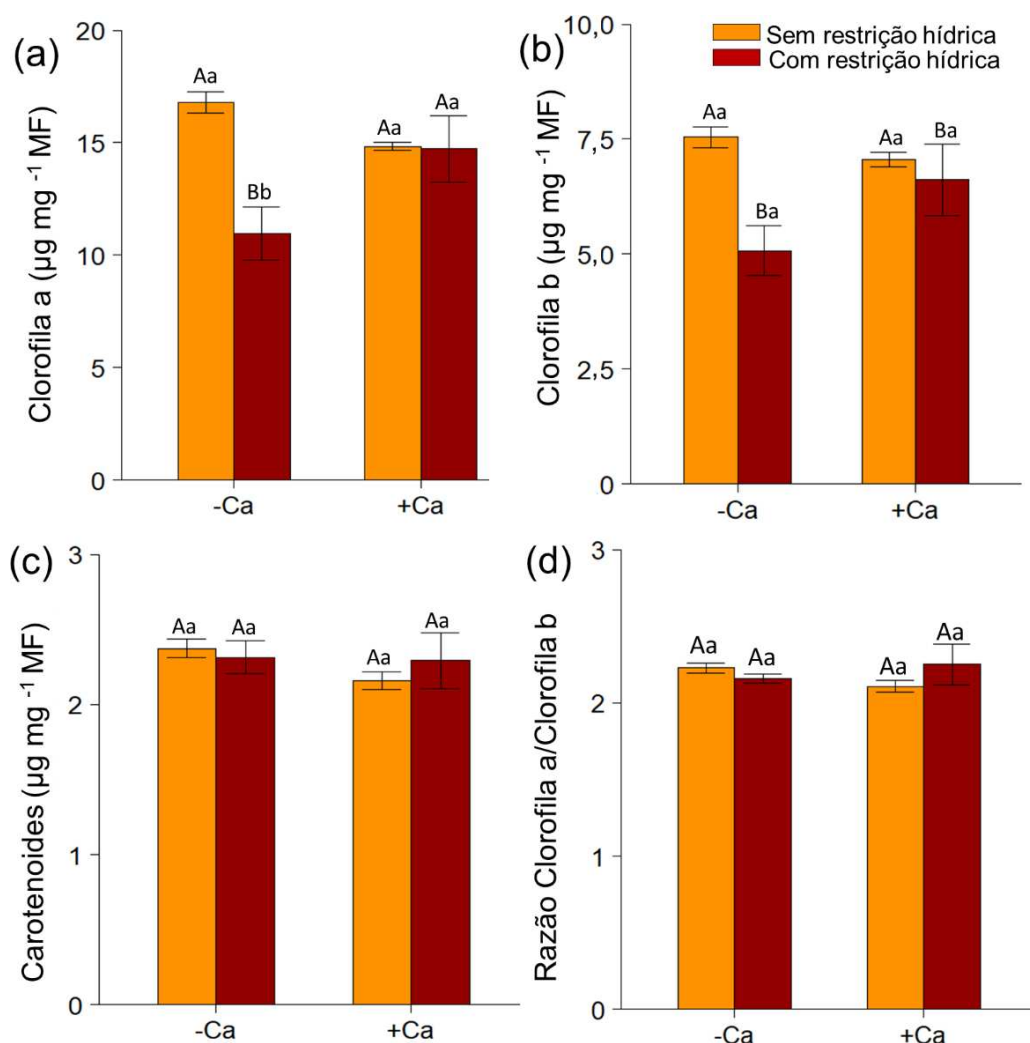


Figura 4. (a) Clorofila *a* (C_a); (b) Clorofila *b* (C_b), (c) Carotenoides e (d) razão clorofila *a/b* em clone eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento

de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

A peroxidação lipídica nas plantas expostas a restrição hídrica aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. Nas plantas expostas à seca cultivadas na ausência de Ca houve aumento 25,3% no conteúdo de MDA, ao passo que as plantas cultivadas na presença de Ca esse aumento foi de aproximadamente 11%. Todas as plantas cultivadas na presença de Ca, independentemente da condição hídrica, apresentaram menores valores de MDA quando comparadas as plantas expostas a ausência de Ca (Fig. 5a).

As plantas expostas à restrição hídrica na ausência de Ca apresentaram aumento (28,62%) nos valores de extravasamento de eletrólitos (EE) em relação ao tratamento sem restrição hídrica (Fig. 5b). Por outro lado, as plantas cultivadas na presença de Ca não apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no EE entre as plantas controle e plantas expostas a restrição hídrica. A restrição hídrica resultou no aumento dos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por outro lado, a presença de Ca levou à diminuição nos teores de H_2O_2 tanto na presença como na ausência de restrição hídrica (Fig. 5c).

A atividade da catalase (CAT) aumentou nas folhas expostas à restrição hídrica na presença de Ca (20%). No entanto, as plantas cultivadas na ausência de Ca não se diferenciaram, se na presença ou ausência da restrição hídrica. A atividade de CAT quando observada nas plantas cultivadas sob restrição hídrica foi maior na presença Ca (Fig.6a) e apresentaram valores semelhantes entre as plantas na condição controle. Já a atividade da superóxido dismutase (SOD) não foi influenciada pelos tratamentos (Fig. 6b).

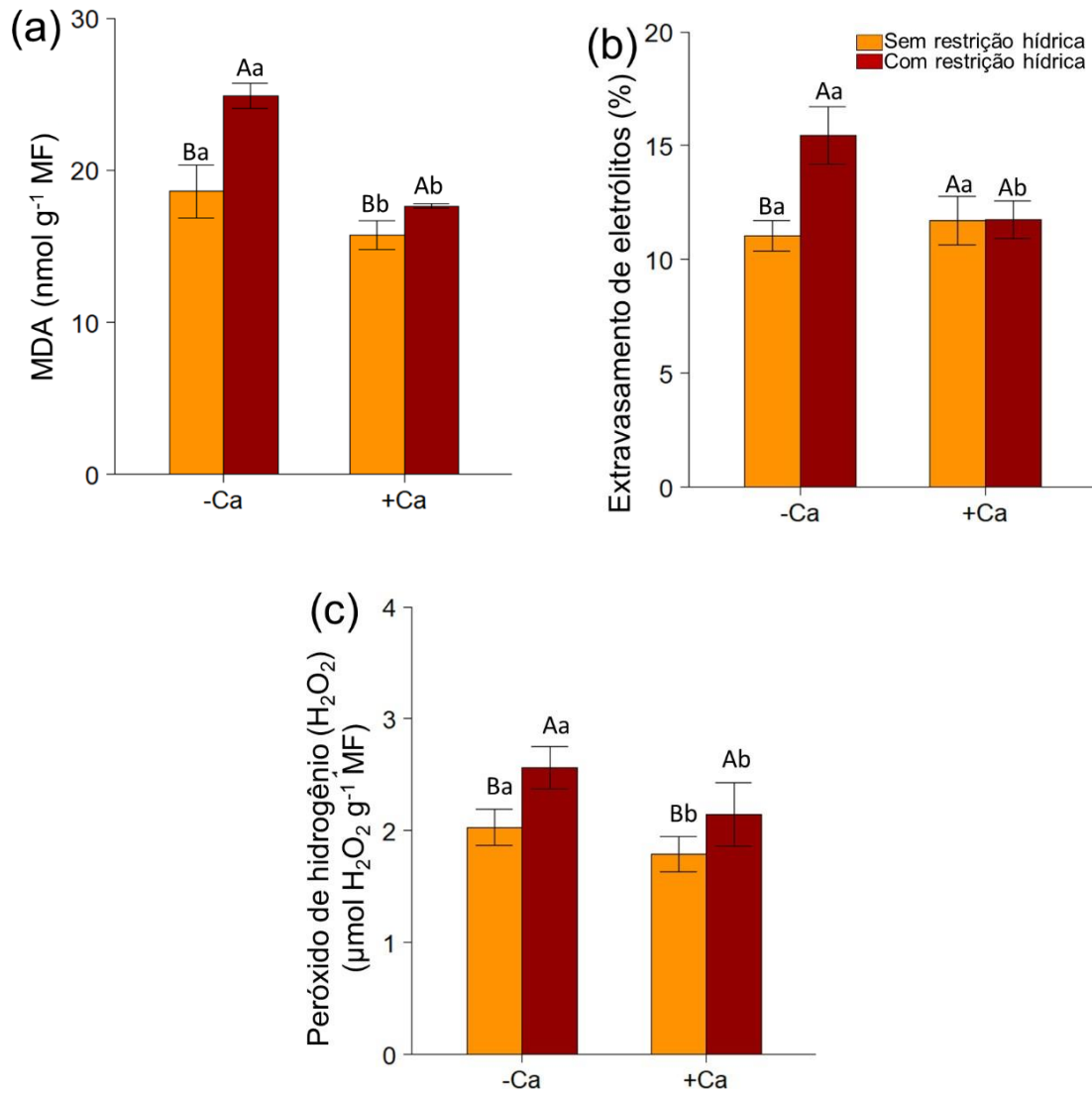


Figura 5. (a) Conteúdo de aldeído malônico (MDA); (b) Extravasamento de eletrólitos e (c) Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em clone eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com ou sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

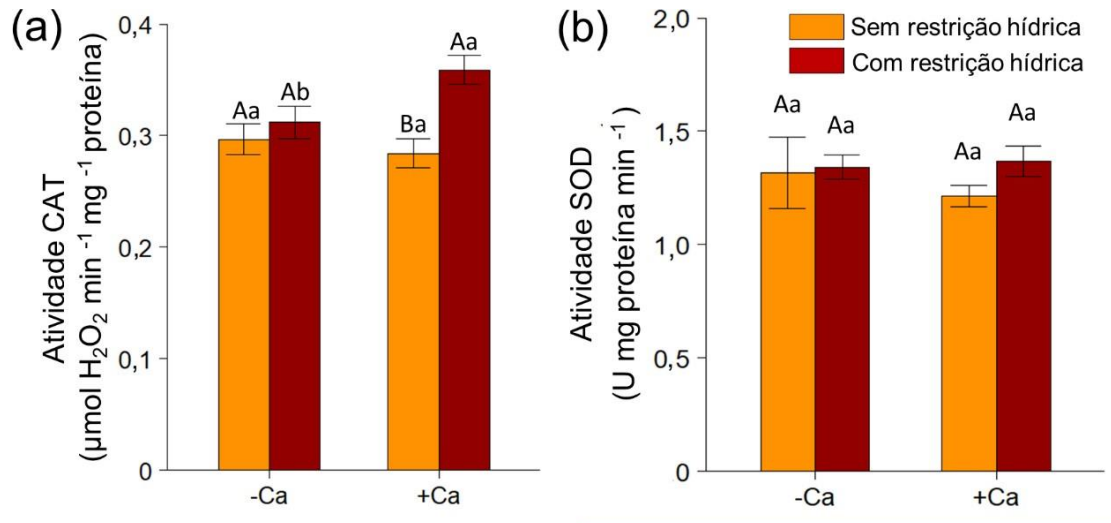


Figura 6. Atividade da enzima catalase (CAT) (a) e superóxido dismutase (SOD) (b) em clone eucalipto tolerante à seca (VM01), cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica. Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

4. DISCUSSÃO

O déficit hídrico foi identificado como principal fator que leva à mortalidade e à redução do crescimento e produtividade do eucalipto nos últimos anos (Stape et al., 2010; Gonçalves et al., 2013). Os resultados deste estudo mostraram que o Ca alivia os danos causados pela seca em plantas de eucalipto. As plantas cultivadas sob restrição hídrica na presença de Ca apresentaram maior hidratação e menor estresse oxidativo em comparação às plantas cultivadas na ausência desse elemento. Apesar deste ter sido realizado com um tratamento de total ausência de Ca em solução nutritiva, o tempo em que as plantas permaneceram nesta condição não foi suficiente para que elas apresentassem danos fisiológicos drásticos devido sua falta, como observado ao se comparar os tratamentos com e sem restrição hídrica.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) e a observação de sintomas são indicadores importantes para avaliar o status de água nas plantas, principalmente durante períodos de seca. Neste estudo, foi observado que as plantas cultivadas sob restrição hídrica apresentaram folhas com sintomas de seca como: murcha, amarelecimento e bordas retorcidas e ressecadas. Esses sintomas ocorreram de maneira mais pronunciada nas plantas cultivadas na ausência de Ca. Além disso, a restrição hídrica reduziu o Ψ_w em todas as plantas submetidas à essa condição. No entanto, o potencial hídrico das plantas tratadas com Ca foi menos negativo comparado com o das plantas cultivadas na ausência de Ca. Isso mostrou que a presença de Ca melhorou a capacidade de absorção de água pela raiz e o status hídrico nas plantas. Estudos demonstram que o Ca regula a atividade das aquaporinas, sugerindo que esse elemento regula o transporte de água através dessas proteínas. Além disso, a aplicação de Ca aumenta o conteúdo de prolina e outros osmólitos e, conseqüentemente, diminui o potencial osmótico das células e aumenta a capacidade de absorção de água (Xu et al., 2013; Muhammad Naeem et al., 2017; Leng et al., 2020).

Durante a ocorrência da deficiência hídrica uma das primeiras respostas fisiológicas das plantas é o fechamento estomático (Chaves et al., 2009; Lehmann and Or, 2015). Esse processo é importante na manutenção do status hídrico nas plantas devido à menor perda de água por transpiração. No entanto, o fechamento estomático, e a conseqüente redução na absorção de CO_2 , é a principal limitação da fotossíntese e crescimento das plantas em situações de seca (Flexas and Medrano, 2002; Martin-StPaul et al., 2017). No presente estudo fica claro que a restrição hídrica causou redução em A , E , g_s e C_i/C_a . Porém, as plantas cultivadas na presença de Ca apresentaram menores quedas nesses índices em situações de seca, o que indica que o Ca reduz os danos fisiológicos causados pela seca em eucalipto. De acordo com Leng et al. (2020), o Ca tem papel importante na regulação da fotossíntese em condições de seca. Ele está envolvido nos processos de reação fotossintética, no movimento dos estômatos, no transporte

fotossintético de elétrons e na fluorescência da clorofila, além de mecanismos de regulação da fotoproteção (Huang et al., 2019; Wang et al., 2019).

O teor de clorofila é um importante parâmetro fisiológico relacionado à fotossíntese em plantas sob déficit hídrico (Ma et al., 2012). Os resultados deste trabalho mostraram que o teor de clorofila *a* (C_a) em eucalipto reduziu nas plantas cultivadas sob seca na ausência de Ca. Ao passo que o teor de clorofila *b* (C_b) reduziu 32,8 e 6,16% % na ausência e presença de Ca, respectivamente, no tratamento com restrição hídrica quando comparado com as plantas controle dentro da mesma dose de Ca. Estudos anteriores relataram o efeito protetor do Ca na estrutura da clorofila sob diferentes estresses como salinidade, calor e temperatura (Jiang and Huang, 2001; Rahman et al., 2016; Li et al., 2017; Min et al., 2021). A degradação da clorofila sob déficit hídrico pode ser consequência do maior acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Pintó-Marijuan and Munné-Bosch, 2014). Neste experimento a inibição da degradação dos teores de C_a e a menor redução nos teores de C_b sob seca nas plantas suplementadas com Ca pode estar relacionada à menor sensibilidade das membranas ao estresse oxidativo. Consequentemente, a manutenção dos teores de C_a sob seca no tratamento com Ca melhorou a função fotossintética das plantas, resultando em menor redução desse pigmento em relação as plantas cultivadas com adequado suprimento de água.

O déficit hídrico aumenta o estresse oxidativo das plantas em razão da maior produção e acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cruz De Carvalho, 2008; Jothimani and Arulbalachandran, 2020). A produção de quantidades excessivas de EROs pode ocasionar a peroxidação lipídica, alterações na integridade da membrana plasmática e danificação dos cloroplastos, o que resulta na inibição das reações fotoquímicas (Cruz De Carvalho, 2008; Anjum et al., 2011). Está bem estabelecido que o conteúdo de MDA e o extravasamento de eletrólitos são importantes indicadores do nível de danos as células vegetais (Garg and Manchanda, 2009; Zhang et al., 2014). No presente estudo, o fornecimento de Ca reduziu

significativamente a permeabilidade das membranas (EE%) e o conteúdo de H₂O₂ no eucalipto sob restrição hídrica. Além disso, houve menores danos oxidativos e peroxidação lipídica das membranas, o que resultou em menores conteúdos de MDA. Esses resultados indicam que o Ca promove a proteção estrutural e funcional das membranas biológicas em plantas de eucalipto sob seca. Diversos estudos mostraram a importância do Ca na manutenção da integridade estrutural e funcional da membrana celular em condições adversas e consequente aumento da tolerância das plantas à seca (Hawkesford et al., 2012; González-Fontes et al., 2017; Xu et al., 2017; Xue et al., 2018; Leng et al., 2020). Tem sido relatado que o fornecimento de Ca ativa o sistema enzimático antioxidante da planta sob condições de estresse (Khushboo et al., 2018; Leng et al., 2020; Rezayian et al., 2020). No entanto, os dados para eucalipto são limitados. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes nas plantas em resposta ao estresse é importante na diminuição do acúmulo de MDA e na manutenção do equilíbrio da produção e liberação das EROs. Neste estudo, as plantas cultivadas na presença de Ca sob restrição hídrica aumentaram a atividade da catalase (CAT). A CAT possui a função de consumir, decompor e remover o excesso de H₂O₂ nas plantas, sendo considerada uma das principais enzimas na diminuição dos efeitos deletérios das EROs (Laxa et al., 2019).

5. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho sugerem que a presença de Ca reduz os danos e mantém a estabilidade da membrana celular sob condições de seca, o que pode resultar em menores danos oxidativos e no aumento do status da água no eucalipto, aumentando assim a tolerância à seca. Portanto, em regiões em que a ocorrência de períodos secos é frequente, cuidados específicos em relação a nutrição cálcica representam uma estratégia importante para mitigar os efeitos da seca nos plantios de eucalipto, garantindo o crescimento e a sobrevivência das árvores em campo.

REFERÊNCIAS

- Abbas M, Abdel-Lattif H, Shahba M. Ameliorative Effects of Calcium Sprays on Yield and Grain Nutritional Composition of Maize (*Zea mays* L.) Cultivars under Drought Stress. *Agric* 2021, Vol 11, Page 285. 2021;11:285. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11040285>
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH (Ted., Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol Manage.* 2010;259:660-84. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2009.09.001>
- An B, Chen Y, Li B, Qin G, Tian S. Ca(2+)-CaM regulating viability of *Candida guilliermondii* under oxidative stress by acting on detergent resistant membrane proteins. *J Proteomics.* 2014;109:38-49. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.06.022>
- Anjum S, Xie X, Wang L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African J Agric Res.* 2011;6:2026-32. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Bennett AC, McDowell NG, Allen CD, Anderson-Teixeira KJ. Larger trees suffer most during drought in forests worldwide. *Nat Plants.* 2015;1. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.139>
- Carle JB, Duval A, Ashfordc S. The future of planted forests. *Int For Rev.* 2020;22:65-80. <https://doi.org/10.1505/146554820829523970>
- Caser M, Lovisololo C, Scariot V. The influence of water stress on growth, ecophysiology and ornamental quality of potted *Primula vulgaris* 'Heidy' plants. New insights to increase water use efficiency in plant production. *Plant Growth Regul.* 2017;83:361-73. <https://doi.org/10.1007/S10725-017-0301-4>
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot.* 2009;103:551-60. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Clark RB. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. *J Plant Nutr.* 1982;5:1039-57. <https://doi.org/10.1080/01904168209363037>
- Cruz De Carvalho MH. Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav.* 2008;3:156-65. <https://doi.org/10.4161/PSB.3.3.5536>
- Duke NC, Kovacs JM, Griffiths AD, Preece L, Hill DJE, Van Oosterzee P, Mackenzie J, Morning HS, Burrows D. Large-scale dieback of mangroves in Australia's Gulf of

Carpentaria: a severe ecosystem response, coincidental with an unusually extreme weather event. *Mar Freshw Res.* 2017;68:1816-29. <https://doi.org/10.1071/MF16322>

ENCE. 2009. Sustainable Forest Management and Eucalyptus, Grupo Empresarial ENCE, Spain. 76 pp.

Fernandes ET, Cairo PAR, Novaes AB De. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica. Physiological responses of eucalyptus clones grown in a greenhouse under water deficit. *Ciência Florest.* 2015;45:29-34. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120152>

Ferreira V, Boyero L, Calvo C, Correa F, Figueroa R, Gonçalves JF, Goyenola G, Graça MAS, Hepp LU, Kariuki S, López-Rodríguez A, Mazzeo N, M'Erumba C, Monroy S, Peil A, Pozo J, Rezende R, Teixeira-de-Mello F. A Global Assessment of the Effects of Eucalyptus Plantations on Stream Ecosystem Functioning. *Ecosystems.* 2019;22:629-42. <https://doi.org/10.1007/S10021-018-0292-7/FIGURES/3>

Flexas J, Medrano H. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. *Ann Bot.* 2002;89:183-9. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf027>

Garg N, Manchanda G. ROS generation in plants: Boon or bane? *Http://DxDoiOrg/101080/11263500802633626.* 2009;143:81-96. <https://doi.org/10.1080/11263500802633626>

Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 1977;59:309-14. <https://doi.org/10.1104/PP.59.2.309>

Gonçalves JL de M, Alvares CA, Higa AR, Silva LD, Alfenas AC, Stahl J, Ferraz SF de B, Lima W de P, Brancalion PHS, Hubner A, Bouillet JPD, Laclau JP, Nouvellon Y, Epron D. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. *For Ecol Manage.* 2013;301:6-27. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2012.12.030>

González-Fontes A, Navarro-Gochicoa MT, Ceacero CJ, Herrera-Rodríguez MB, Camacho-Cristóbal JJ, Rexach J. Understanding calcium transport and signaling, and its use efficiency in vascular plants. Elsevier Inc.; 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811308-0.00009-0>

Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IS, White P. Functions of Macronutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.* Elsevier; 2012. p. 135-89. . <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>

Huang LY, Li ZZ, Duan TY, Wang L, Zhang YQ, Li J. Regulation of exogenous calcium on photosynthetic system of honeysuckle under salt stress. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 2019;44:1531-6. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20190322.101>

- IPCC (2019). *Climate Change and Land: An IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse Gas Fluxes in Terrestrial Ecosystems*. Geneva: IPCC
- Ilyas M, Nisar M, Khan N, Hazrat A, Khan AH, Hayat K, Fahad S, Khan A, Ullah A. Drought Tolerance Strategies in Plants: A Mechanistic Approach. *J Plant Growth Regul.* 2020;1-19. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10174-5>
- Jiang Y, Huang B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. *J Exp Bot.* 2001;52:341-9
- Jimenez S, Dridi J, Gutierrez D, Moret D, Irigoyen JJ, Moreno MA, Gogorcena Y. Physiological, biochemical and molecular responses in four *Prunus* rootstocks submitted to drought stress. *Tree Physiol.* 2013;33:1061-75. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt074>
- Jothimani K, Arulbalachandran D. Physiological and biochemical studies of black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) under polyethylene glycol induced drought stress. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2020;29:101777. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101777>
- Kang J, Zhao W, Zheng Y, Zhang DM, Zhou H, Sun P. Calcium chloride improves photosynthesis and water status in the C4 succulent xerophyte *Haloxylon ammodendron* under water deficit. *Plant Growth Regul.* 2017;82:467-78. <https://doi.org/10.1007/S10725-017-0273-4/TABLES/6>
- Khushboo, Bhardwaj K, Singh P, Raina M, Sharma V, Kumar D. Exogenous application of calcium chloride in wheat genotypes alleviates negative effect of drought stress by modulating antioxidant machinery and enhanced osmolyte accumulation. *Vitr Cell Dev Biol - Plant.* 2018;54:495-507. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9912-3>
- Laxa M, Liebthal M, Telman W, Chibani K, Dietz KJ. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants.* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>
- Lehmann P, Or D. Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytol.* 2015;207:1015-25. <https://doi.org/10.1111/NPH.13442>
- Leng X, Xue L, Wang J, Li S, Yang Z, Ren H, Yao X, Wu Z, Li J. Physiological responses of *handeliendron bodinieri* (Levl.) rehd. to exogenous calcium supply under Drought stress. *Forests.* 2020;11:1-14. <https://doi.org/10.3390/f11010069>
- Li L, Su H, Ma H, Lyu D. Differential Proteomic Analysis Reveals the Effect of Calcium on *Malus baccata* Borkh. Leaves under Temperature Stress. *Int J Mol Sci* 2017, Vol 18, Page 1755. 2017;18:1755. <https://doi.org/10.3390/IJMS18081755>
- Locatelli M, Barros N., Neves JC., Novais RF. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *Rev Árvore.* 1984:53-69

- Lundqvist SO, Grahn T, Olsson L, Seifert T. Comparison of wood, fibre and vessel properties of drought-tolerant eucalypts in South Africa. *South For.* 2017;79:215-25. <https://doi.org/10.2989/20702620.2016.1254910>
- Ma Q, Yue LJ, Zhang JL, Wu GQ, Bao AK, Wang SM. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiol.* 2012;32:4-13. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPR098>
- Martin-StPaul N, Delzon S, Cochard H. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecol Lett.* 2017;20:1437-47. <https://doi.org/10.1111/ELE.12851>
- Martins GS, Freitas NC, Máximo WPF, Paiva LV. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *J Plant Physiol.* 2018;229:122-31. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.007>
- Min K, Liu B, Lee SR, Arora R. Supplemental calcium improves freezing tolerance of spinach (*Spinacia oleracea* L.) by mitigating membrane and photosynthetic damage, and bolstering anti-oxidant and cell-wall status. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2021;288:110212. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110212>
- Naeem M., Ansari AA, Gill SS. Essential plant nutrients: Uptake, use efficiency, and management. *Essent Plant Nutr Uptake, Use Effic Manag.* 2017:1-569. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4>
- Naeem Muhammad, Naeem MS, Ahmad R, Ihsan MZ, Ashraf MY, Hussain Y, Fahad S. Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. *Arch Agron Soil Sci.* 2017;64:116-31. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1327713>
- Naeem M, Traub JR, Athar H ur R, Loescher W. Exogenous calcium mitigates heat stress effects in common bean: a coordinated impact of photoprotection of PSII, up-regulating antioxidants, and carbohydrate metabolism. *Acta Physiol Plant.* 2020;42:180. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03171-4>
- Payn T, Carnus JM, Freer-Smith P, Kimberley M, Kollert W, Liu S, Orazio C, Rodriguez L, Silva LN, Wingfield MJ. Changes in planted forests and future global implications. *For Ecol Manage.* 2015;352:57-67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.06.021>
- Pintó-Marijuan M, Munné-Bosch S. Photo-oxidative stress markers as a measure of abiotic stress-induced leaf senescence: advantages and limitations. *J Exp Bot.* 2014;65:3845-57. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU086>
- Pinto SI do C, Neto AEF, Neves JCL, Faquin V, Moretti B da S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivadas em solução nutritiva. *Rev Bras Ciência Do Solo.* 2011; 35:523-533

- Rahman A, Nahar K, Hasanuzzaman M, Fujita M. Calcium supplementation improves Na⁺/K⁺ ratio, antioxidant defense and glyoxalase systems in salt-stressed rice seedlings. *Front Plant Sci.* 2016;7:609. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00609/BIBTEX>
- Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Improving tolerance against drought in canola by penconazole and calcium. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;149:123-36. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.06.007>
- Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Penconazole and calcium ameliorate drought stress in canola by upregulating the antioxidative enzymes. *Funct Plant Biol.* 2020;47:825-39. <https://doi.org/10.1071/FP19341>
- Ribeiro C, Cambraia J, Peixoto PHP, da Fonseca Júnior ÉM. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. *Brazilian J Plant Physiol.* 2012;24:107-16. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202012000200004>
- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro R V., Machado EC, Pimentel C, Santos MG. Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *South African J Bot.* 2016;103:101-7. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2015.08.008>
- Santos EF, Mateus NS, Rosário MO, Garcez TB, Mazzafera P, Lavres J. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol Plant.* 2021;172:552-63. <https://doi.org/10.1111/PPL.13228>
- Silva EN, Silveira JAG, Ribeiro R V., Vieira SA. Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. *Environ Exp Bot.* 2015;110:36-45. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2014.09.008>
- Stape J, Binkley D, Ryan M, Fonseca S, Loos R, Takahashi E, Silva C, Silva S, Hakamada R, Fereira J, Lima A, Gava J, Leite F, Andrade H, Alves J, Silva G, Azevedo M. The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production. *For Ecol Manage.* 2010;259:1684-94. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2010.01.012>
- Thor K. Calcium—Nutrient and Messenger. *Front Plant Sci.* 2019;10:440. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>
- Upadhyaya H, Panda SK, Dutta BK. CaCl₂ improves post-drought recovery potential in *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze. *Plant Cell Rep.* 2011;30:495-503. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0958-x>
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*

2000;151:59-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)

Wang Q, Yang S, Wan S, Li X. The significance of calcium in photosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1353. <https://doi.org/10.3390/ijms20061353>

Wang WH, Chen J, Liu TW, Han AD, Simon M, Dong XJ, He JX, Zheng HL. Regulation of the calcium-sensing receptor in both stomatal movement and photosynthetic electron transport is crucial for water use efficiency and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2014;65:223-34. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT362>

Wu Y, Liu X, Wang W, Zhang S, Xu B. Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions. *Plant Physiol Biochem.* 2012;58:212-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.005>

Xu C, Li X, Zhang L. The Effect of Calcium Chloride on Growth, Photosynthesis, and Antioxidant Responses of *Zoysia japonica* under Drought Conditions. *PLoS One.* 2013;8:e68214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068214>

Xu D, Wang W, Gao T, Fang X, Gao X, Li J, Bu H, Mu J. Calcium alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing antioxidant metabolism and adjusting solute accumulation in *Calligonum mongolicum*. *Conserv Physiol.* 2017;5. <https://doi.org/10.1093/conphys/cox060>

Xue L, Ren H, Long W, Leng X, Wang J, Yao X, Li S. Ecophysiological Responses of *Calcicole Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst. to Drought Stress and Calcium Supply. For 2018, Vol 9, Page 667. 2018;9:667. <https://doi.org/10.3390/F9110667>

Zhang LX, Lai JH, Liang ZS, Ashraf M. Interactive Effects of Sudden and Gradual Drought Stress and Foliar-applied Glycinebetaine on Growth, Water Relations, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Defence System in Two Maize Cultivars Differing in Drought Tolerance. *J Agron Crop Sci.* 2014;200:425-33. <https://doi.org/10.1111/JAC.12081>

Zheng H, Zhang X, Ma W, Song J, Rahman SU, Wang J, Zhang Y. Morphological and physiological responses to cyclic drought in two contrasting genotypes of *Catalpa bungei*. *Environ Exp Bot.* 2017;138:77-87. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.016>

CAPÍTULO 3

EFEITO DA RESTRIÇÃO HÍDRICA E DO CÁLCIO NA EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS EM RAÍZES DE EUCALIPTO

RESUMO

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Efeito da restrição hídrica e do cálcio na expressão de aquaporinas em raízes de eucalipto.** Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Samuel Vasconcelos Valadares

As aquaporinas são proteínas de canais presentes nas membranas biológicas que possuem importante papel no transporte de água e pequenas moléculas através das membranas biológicas. Dentre as subfamílias de aquaporinas, as proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP) desempenham importante função na absorção e transporte de água. Essas proteínas possuem regulação altamente variável entre isoformas distintas, além de serem influenciadas por fatores ambientais. Existem diversos estudos sobre a regulação dessas proteínas em plantas herbáceas, porém para plantas lenhosas os estudos são escassos. Nesse estudo, o objetivo foi investigar os efeitos da restrição hídrica e da disponibilidade de Ca sobre a expressão de isoformas das subfamílias PIP1 e PIP2. Para isso, plantas do clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*), considerado tolerante à seca, foram cultivadas em solução hidropônica e submetidas à restrição hídrica pela adição de polietilenoglicol 6000 e ausência ou presença de cálcio (Ca). Foi determinado o potencial hídrico foliar e a expressão gênica de diferentes isoformas de PIP nas raízes em três tempos de amostragem. Foi observado que o potencial hídrico foliar reduziu de maneira progressiva com a seca nos diferentes tempos, porém nas plantas cultivadas na presença de Ca se mantiveram mais hidratadas. No início da imposição da restrição hídrica houve aumento da expressão gênica das isoformas *PIP1;2*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7*, e após maior período nessa condição a expressão foi reduzida. Nos tratamentos com Ca, houve redução da expressão de genes associados às *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7* no último tempo de amostragem. Os resultados demonstram respostas diferenciadas das PIP nas raízes do eucalipto, e que os mecanismos regulatórios se diferenciam de acordo com a duração do estresse e da dose de Ca. Além disso, os resultados retratam a importância do Ca na regulação das aquaporinas e no aumento da hidratação das plantas de eucalipto sob condições de restrição hídrica.

ABSTRACT

BARROS, Patricia Ramalho de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Effect of water and calcium restriction on aquaporin expression in eucalyptus roots.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Alice Pita Barbosa e Samuel Vasconcelos Valadares

Aquaporins are channel proteins present in biological membranes that play an important role in the transport of water and small neutral molecules across biological membranes. Among the subfamilies of aquaporins, intrinsic membrane proteins (PIP) play an important role in water absorption and transport. These proteins have highly variable regulation between different isoforms and are influenced by environmental factors. There are several studies on the regulation of these proteins in herbaceous plants, but for woody plants the studies are scarce. In this study, the objective was to investigate the effects of water restriction and calcium availability on the expression of isoforms from the PIP1 and PIP2 subfamilies. For this, seedlings of the drought-tolerant clone VM01 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*) were cultivated in hydroponic solution and subjected to water restriction by the addition of polyethylene glycol 6000 with or without calcium (Ca). Leaf water potential and gene expression of different PIP isoforms in roots were determined at three sampling times. It was observed that leaf water potential progressively reduced with drought at different times, but plants were hydrated when growing the presence of Ca. In addition, *PIP1;2*, *PIP2;1*, *PIP2;2* and *PIP2;7* expression increased at the beginning of water restriction imposition and reduced after a longer period of restriction. In treatments with Ca, there was a reduction in the expression of genes associated with *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* and *PIP2;7* in the last sampling time. The results demonstrate that the responses and regulatory mechanisms of expression of PIPs in the roots of tolerant eucalyptus clones change according to the duration of stress. Furthermore, we demonstrated the importance of Ca in the aquaporins regulation and the increase in the hydration of eucalyptus plants under water restriction conditions.

1. INTRODUÇÃO

A limitação hídrica é um dos principais fatores associados à redução da produtividade vegetal no planeta (Ahanger et al., 2016; Basu et al., 2016). A captação e transporte da água são estratégias importantes que levam à adaptação de plantas a ambientes secos (Scharwies and Dinneny, 2019).

As aquaporinas (AQP), uma família de proteínas intrínsecas de membrana, desempenham papel essencial nesses processos (Patel and Mishra, 2021), por atuarem como facilitadoras da difusão de água e alguns íons através das membranas celulares.

As AQP são classificadas em cinco subfamílias em função de sua localização e características estruturais, como proteínas intrínsecas da membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas do tipo nodulina (NIP), pequenas proteínas intrínsecas básicas (SIP) e proteínas intrínsecas não caracterizadas (XIP) (Maurel et al., 2015a; Singh et al., 2020a). A subfamília PIP e suas isoformas são as mais numerosas (Kapilan et al., 2018), além de serem as principais AQP relacionadas à regulação do transporte de água através da membrana plasmática, incluindo a captação de água do solo (Yanef et al., 2015; Ahmed et al., 2021). Devido à função das AQP na aquisição e transporte de água, essas proteínas estão sendo apontadas como importantes alvos para a melhoria da tolerância das plantas à seca (Zargar et al., 2017).

A disponibilidade hídrica afeta de maneira diferencial a expressão dos genes das AQP nas raízes (Afzal et al., 2016). Alguns trabalhos demonstraram que ocorre aumento no nível de mRNA em condições de seca, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática e facilitando a aquisição e transporte de água (Shekoofa and Sinclair, 2018). Por outro lado, outros estudos relatam que as AQP são reguladas negativamente quando as plantas são expostas a longos períodos de seca, de modo a evitar o transporte reverso de água da raiz para o solo seco (Alexandersson et al., 2005; Perrone et al., 2012; Maurel et al., 2015b; Afzal et al., 2016).

Essas diferenças na regulação das AQP em condições de seca sugerem que isoformas pertencentes à mesma família podem desempenhar diferentes papéis em resposta à seca (Hachez et al., 2006; Šurbanovski and Grant, 2014).

O cálcio (Ca) desempenha papel chave na função das AQP (Wang et al., 2016). No entanto, a função desse nutriente no transporte de água pelas AQP envolve processos complexos e precisam ser investigados. Foi relatado que em condições de déficit hídrico, o fornecimento de Ca melhora o fluxo de água célula a célula pela regulação da expressão dessas proteínas em plantas de milho, otimizando o uso da água (Wu et al., 2012). Por outro lado, em situações de estresse, o aumento das concentrações citosólicas de Ca resultou na diminuição da expressão dos genes de AQP (Alleva et al., 2006; Martínez-Ballesta et al., 2008a). Percebe-se, portanto, que os efeitos do Ca sobre as AQP são contraditórios e mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios.

Apesar do conhecimento básico sobre a regulação das AQP em plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, e em outras espécies herbáceas, o significado funcional da atividade das AQP em espécies lenhosas permanece pouco explorado. Nesse contexto, o gênero *Eucalyptus* se destaca por ser um dos gêneros florestais mais cultivados mundialmente (Payn et al., 2015; Carle et al., 2020). Esse gênero possui grande importância, pois pode ser manejado em rotações curtas, por apresentar crescimento rápido, adaptabilidade a várias condições, incluindo aquelas em que a precipitação pluviométrica é baixa, e propriedades superiores da madeira (Ghosh Dasgupta and Dharanishanthi, 2017). Esforços têm sido realizados a fim de compreender os mecanismos de tolerância à seca de várias espécies de eucalipto, com o intuito de possibilitar a seleção de genótipos mais tolerantes para cultivo em regiões afetadas pela seca.

Dentre os clones de eucalipto disponíveis, híbridos de *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus camaldulensis* têm se destacado por apresentarem maior tolerância à seca em comparação com outros clones mais amplamente cultivados no Brasil (Fernandes et al., 2015;

Martins et al., 2018; Santos et al., 2020). Estudos preliminares demonstraram que clones dessas espécies acumulam teores elevados de Ca nos tecidos, principalmente nas raízes em situações de restrição hídrica (Souza, 2019; Barros Leite, 2022). Partindo da premissa que o Ca atua como regulador da expressão de AQP e que é um possível agente que contribui para o aumento da tolerância à seca, objetivamos investigar os efeitos da restrição hídrica e da disponibilidade de Ca sobre a expressão gênica de *PIP1* e *PIP2*, isoformas localizadas na membrana plasmática que podem contribuir para o processo de absorção de água pelas raízes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de crescimento das plantas e desenho experimental

Foram selecionadas mudas do clone de eucalipto VM01 (*E. urophylla* × *camaldulensis*), caracterizado como tolerante à seca (Fernandes et al., 2015; Martins et al., 2018; Santos et al., 2020). As mudas foram aclimatadas em casa de vegetação, em vasos de polietileno contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1982), adaptada por Locatelli et al. (1984), sob aeração constante (Tabela 1). O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e mantido próximo a 6. Na fase inicial do período de aclimação das plantas, a solução de cultivo teve força iônica equivalente a 50% da solução padrão por sete dias. Após esse período, a força iônica da solução foi elevada até 100% da solução padrão (Pinto et al., 2011). As trocas de solução foram realizadas semanalmente. Após 15 dias de aclimação, as plantas foram separadas em dois grupos: metade das plantas recebeu a solução nutritiva com Ca e a outra metade foi mantida sem Ca durante 12 dias.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva, correspondente a 100% da solução padrão usada durante o crescimento das mudas de eucalipto.

Reagentes químicos	Concentração (mmol L ⁻¹)	Reagentes químicos	Concentração (μmol L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	2.925	Fe-EDTA	40
CaCl ₂	1.3	MnCl ₂	7
K ₂ SO ₄	0.3	H ₃ BO ₃	19
MgSO ₄	0.3	ZnSO ₄	2
KCl	0.53	CuSO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.138	Na ₂ MoO ₄	0.086

Após o período de aclimação e omissão de Ca, metade das plantas de cada grupo foi mantida com disponibilidade normal de água e a outra metade submetida à restrição hídrica. A restrição hídrica foi imposta pela adição de polietileno glicol (PEG 6000) (Michel e Kaufmann, 1973). A adição de PEG 6000 foi realizada de maneira gradativa até que a solução atingisse os potenciais hídricos de -0,15 e -0,65 MPa. Para atingir o potencial de -0,15 e -0,65 MPa foram adicionadas 100 e 235 g/L de PEG 6000, respectivamente. Inicialmente, adicionou-se quantidade suficiente para atingir 25% do potencial hídrico final de cada tratamento. Durante os quatro dias seguintes esse valor foi gradualmente elevado em 25 % a cada dia.

2.2. Coleta do material vegetal

As avaliações fisiológicas e a coleta do material vegetal foram realizadas em três tempos, denominados T1, T2 e T3:

- T1: O material foi coletado 24 h após a solução atingir o potencial hídrico de -0,15 MPa (5º dia após o início da adição de PEG)
- T2: O material foi coletado após 24h que a solução atingiu -0,65 MPa (10º dia após o início da adição de PEG).
- T3: O material foi coletado após seis dias de as plantas permanecerem no potencial de

– 0,65 MPa (16° dia após o início da adição de PEG)

A solução nutritiva foi substituída após a realização de cada coleta. Em cada tempo, uma planta foi coletada e amostras do ápice das raízes (5 cm) foram congeladas em N₂ líquido e imediatamente armazenadas a -80 °C.

2.3. *Potencial hídrico foliar*

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado no momento de cada coleta, em cinco réplicas por tratamento (n=20) na antemanhã (normalmente entre 4 e 5h da manhã), em folhas completamente expandidas usando câmara de pressão do tipo ‘Scholander’ (PMS-1000; PMS Instruments, Albany, NY, EUA).

2.4. *Expressão gênica*

A determinação dos níveis de expressão dos genes codificantes de AQP foi realizada em quatro réplicas por tratamento (n = 16) em cada tempo avaliado. O RNA total foi extraído de ápices radiculares com aproximadamente 5 cm de comprimento. O procedimento de extração, descrito a seguir, foi adaptado a partir do protocolo proposto por Chang et al. (1993). Preparou-se o tampão de extração de RNA (contendo 2% CTAB, 2% PVP-40, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 25 mM EDTA pH 8,0) que foi aquecido a 65 °C e adicionado ao material vegetal, juntamente com 2% β -mercaptoetanol, e incubado a 65 °C por 20 min. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada e adicionou-se uma mistura contendo clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v/v). A extração foi seguida por centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos, aos quais adicionou-se LiCl 8 M, em quantidade correspondente a 1/3 do volume do sobrenadante. A mistura resultante foi deixada em repouso durante 24 h a 4 °C e, posteriormente, foi centrifugada a 9.000 g por 20 min a 4 °C. O precipitado final foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em 20 μ l de água tratada com

dietilpirocarbonato autoclavada. O tratamento para remoção de DNA com DNase I (Invitrogen) foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade física do RNA foi verificada em gel de agarose 1,2% p/v e a concentração foi determinada em NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). A síntese de cDNA foi realizada por meio do kit ImProm-II (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

As sequências de nucleotídeos dos genes alvo foram obtidas nas plataformas NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) para *Eucalyptus grandis*. Os primers foram desenhados na plataforma Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), conforme apresentado na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) e meio de reação iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Promega). A opção Fast foi utilizada na velocidade de rampa e a fluorescência foi medida a 60 ° C durante 40 ciclos. Após esta etapa, foi realizada uma curva de dissociação para checar a especificidade dos primers. Para normalização dos valores de expressão gênica foi usado o gene que codifica proteínas contendo domínio SAND (SAND) (Martins et al., 2018). A abundância relativa dos transcritos foi calculada usando o método $2^{-\Delta CT}$ baseado na fórmula descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 2. Primers usados na análise de expressão gênica por qRT-PCR

Gene	GenBank ¹	Sequência do primer	
		Senso 5'-3'	Anti senso 5'-3'
<i>PIP1;2</i>	XM_010069204.2	CCTGGGATGACCAGTGGATTT	CCGGGACCATCAGACCTTTC
<i>PIP1;3</i>	XM_010054942.2	CAGGGACTCCCATGTTCTATTT	CAGCTCCAATGAAGGGTCCA
<i>PIP2;1</i>	XM_010048351.2	AAGGCATGGGATGAACAATGGA	GAAAGCCAACCTCTAGGGGCA
<i>PIP2;2</i>	XM_010039659.2	GCGTGGGATGACCAATGGATATT	GCACGCTACGTACTGACACA
<i>PIP2;7</i>	XM_010033696.2	GGCTACAGCAAGGGGACTG	GGTGCCAACACGGGGACAT

¹NCBI Reference Sequence (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.5. Análises estatísticas

Os dados de cada tempo (T1, T2 e T3) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Para testar os pressupostos da ANOVA de normalidade de resíduos e homogeneidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e Barlett. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o software estatístico R versão 4.0.0 (R Core 2020).

2. RESULTADOS

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) reduziu significativamente no tratamento com restrição hídrica em todos os tempos de amostragem. Nos tempos 1 e 2 (T1 e T2) não houve efeito do Ca sobre essa variável. No entanto, no tempo 3 (T3) as plantas sob restrição hídrica cultivadas nos tratamentos com Ca apresentaram maiores valores de Ψ_w em relação as plantas cultivadas na ausência desse nutriente. Nos tratamentos sem restrição hídrica o Ψ_w não foi influenciado pela aplicação de Ca.

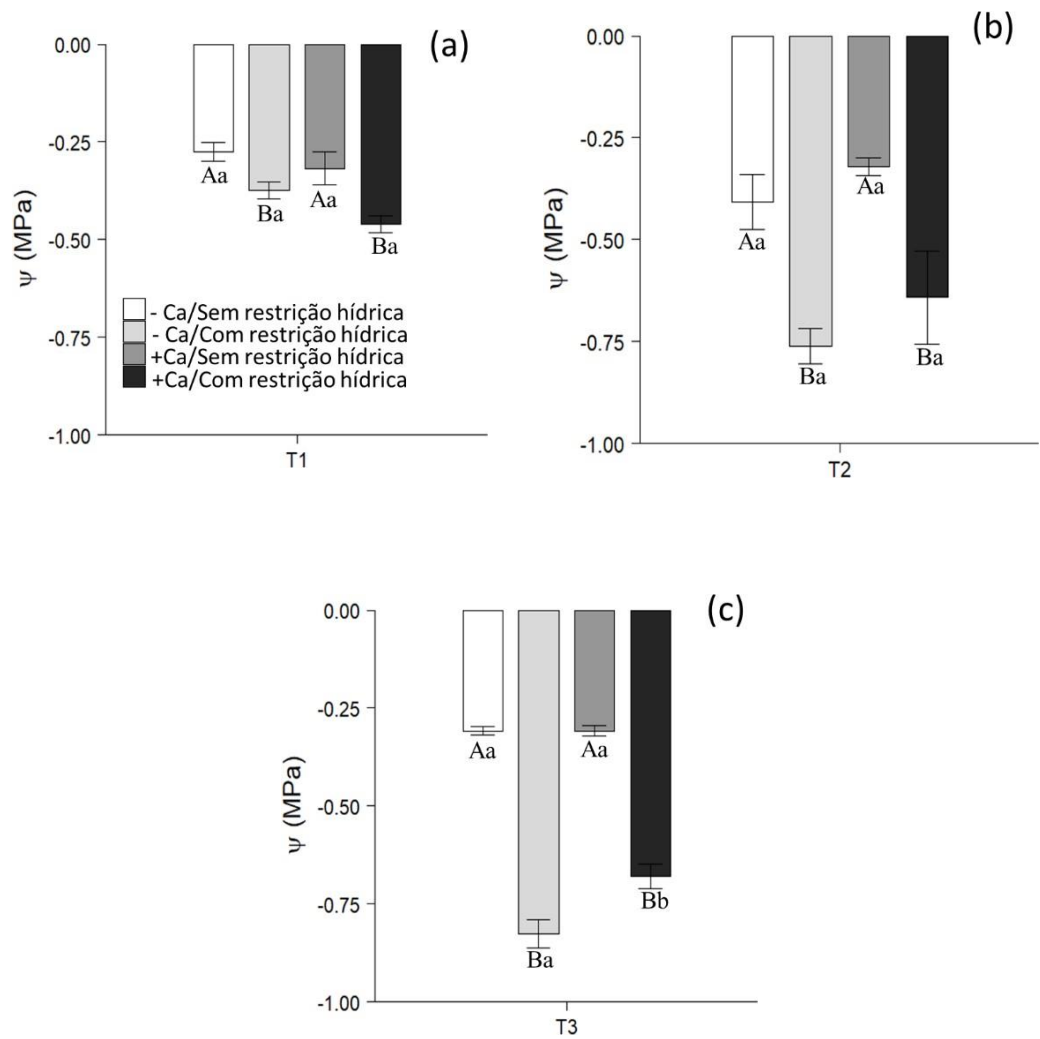


Figura 1. Potencial hídrico foliar (Ψ_w) na antemã na clone de eucalipto VM01 cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica, em três tempos de amostragem. (a) T1- 5° dia após adição de PEG (-0,15 MPa); (b) T2-10° dia após adição de PEG (-0,65 MPa); (c) T3: 16° dia após adição de PEG (-0,65 MPa). Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica). Letras minúsculas indicam efeito significativo para os tratamentos com e sem suprimento de cálcio ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

Os níveis de expressão de cinco genes codificantes de aquaporinas (AQP) da subfamília PIP foram quantificados em raízes de eucalipto em três momentos diferentes. De maneira geral, a abundância de transcritos dos genes das AQP do grupo PIP aumentaram a expressão no tempo 1 na presença de restrição hídrica. Esse efeito foi significativo ($p < 0,05$), exceto para isoforma *PIP1;3* que apresentou valores estáveis na expressão no tratamento com ou sem restrição hídrica. A restrição hídrica aumentou a expressão da *PIP2;2* somente nas plantas cultivadas com Ca. A expressão de *PIP2;1* foi maior nas plantas cultivadas na presença de Ca em relação as plantas sem Ca. Por outro lado, a expressão de *PIP2;7* foi menor na presença de Ca, em relação as plantas cultivadas na ausência de Ca (Fig. 2).

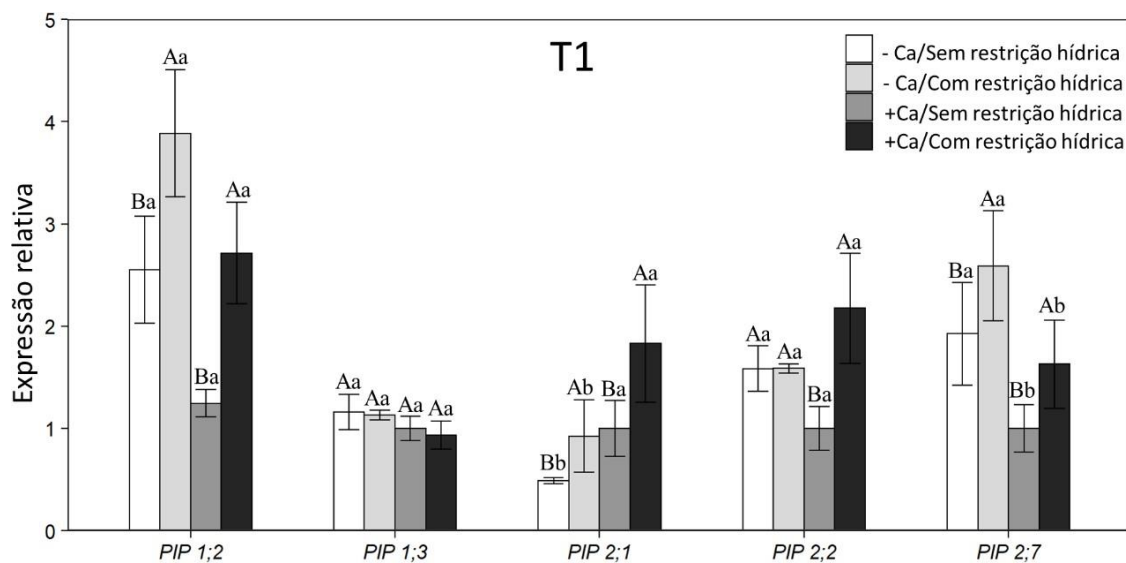


Figura 2. Expressão relativa das aquaporinas (*PIP1;2*, *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7*), no clone de eucalipto VM01 cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica no tempo 3 (T3). T3- 16º dia após adição de PEG (-0,15 MPa). Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica). Letras minúsculas indicam efeito significativo para os tratamentos com e sem suprimento de cálcio ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

No tempo 2, a restrição hídrica resultou em redução significativa na expressão gênica de *PIP1;3*, *PIP2;2* e *PIP2;7*. No entanto, para *PIP1;3* e *PIP2;7* essa redução foi observada apenas no tratamento com presença de Ca. Por outro lado, para o gene *PIP1;2* houve comportamento contrário, com regulação positiva nos tratamentos com restrição hídrica, independente da dose de Ca. O gene *PIP1;2* foi menos expresso nas plantas cultivadas na presença de Ca, independente da condição hídrica. Ao passo que para *PIP1;3* a presença de Ca reduziu a expressão gênica apenas no tratamento com restrição hídrica. Por outro lado, presença de Ca aumentou a expressão do gene *PIP2;7* no tratamento sem restrição hídrica (Fig. 3).

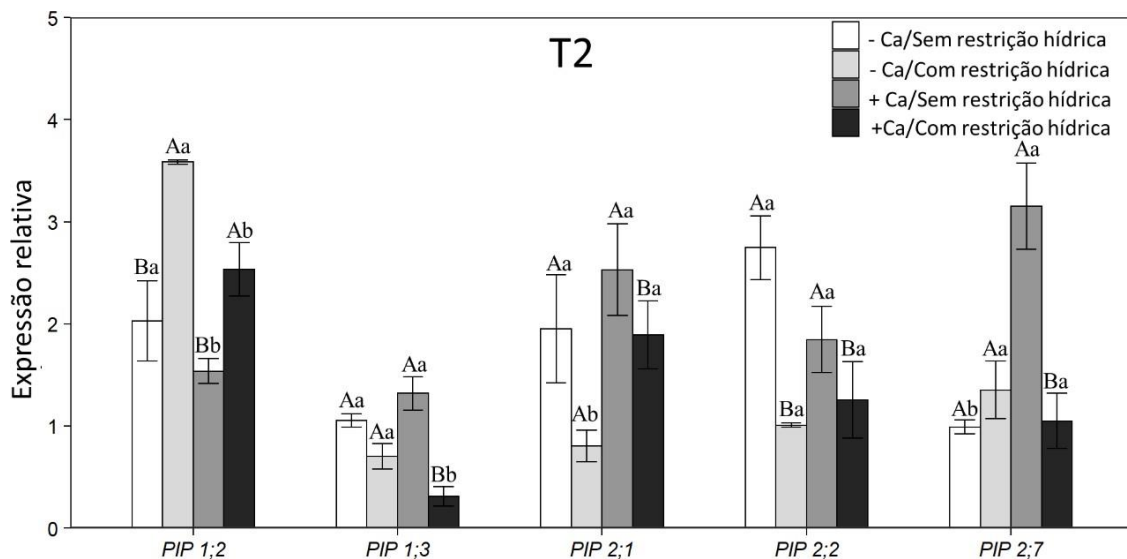


Figura 3. Expressão relativa das aquaporinas (*PIP1;2*, *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7*), no clone de eucalipto VM01 cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com ou sem restrição hídrica no tempo 2 (T2). T2- 10º dia após adição de PEG (-0,65 MPa). Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica). Letras minúsculas indicam efeito significativo para os tratamentos com e sem suprimento de cálcio ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

No tempo 3, o tratamento com restrição hídrica e presença de Ca resultou em diminuição significativa na expressão gênica da maioria das PIPs avaliadas. Essa redução foi observada para *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7*. Em contrapartida, o tratamento com restrição hídrica e

ausência de Ca causou a regulação positiva das isoformas *PIP 1;2*, *PIP 1;3* e *PIP 2;7*. No tratamento sem restrição hídrica, as plantas cultivadas na presença de Ca apresentaram menor expressão gênica de todas as PIP estudadas, exceto *PIP 2;1* que não apresentou diferenças significativas (Fig. 4).

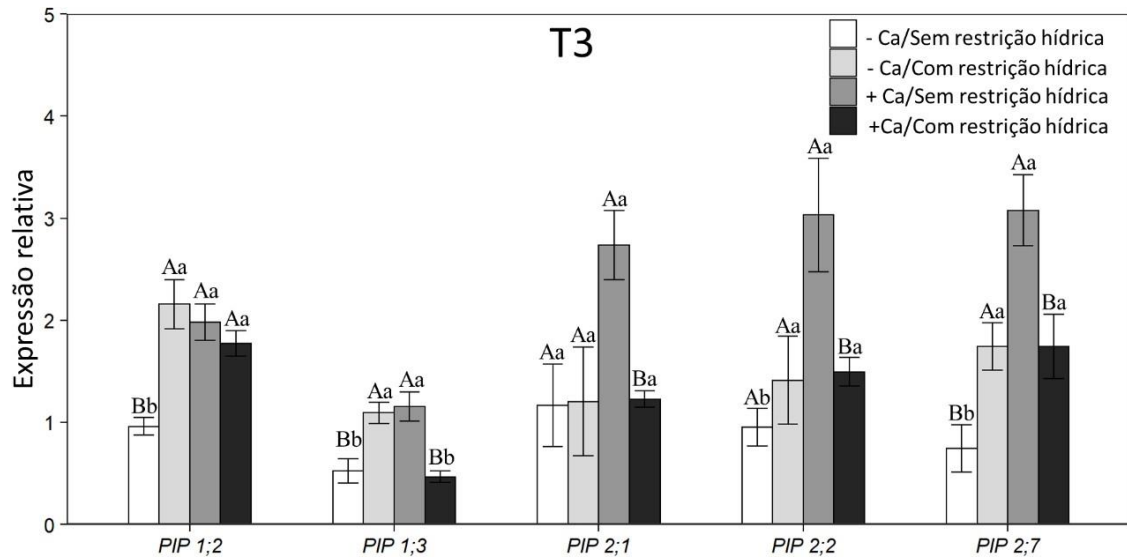


Figura 4. Expressão relativa das aquaporinas (*PIP1;2*, *PIP1;3*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7*), no clone de eucalipto VM01 cultivado em solução hidropônica na presença ou ausência de cálcio, com e sem restrição hídrica no tempo 3 (T3). T3- 16º dia após adição de PEG (-0,65 MPa). Letras maiúsculas diferentes indicam o efeito significativo da condição hídrica (com e sem restrição hídrica) dentro de um mesmo suprimento de cálcio. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre o suprimento de cálcio dentro de uma mesma condição hídrica ($p \leq 0,05$, teste de Tukey). Barras representam média \pm erro padrão.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que a expressão gênica das proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP) em raízes de plantas de eucalipto tolerantes à seca (clone VM01) variou de maneira diferencial de acordo com o tempo de exposição à restrição hídrica. Em um momento inicial, em que o potencial hídrico começa a ser reduzido no meio externo, a maioria dos genes das PIP apresentou aumento na expressão, a fim de otimizar a absorção de água, sendo esse padrão observado tanto na presença quanto na ausência de Ca. No entanto, após um maior período de tempo sob restrição hídrica, a expressão da maioria genes das PIP foi reduzida, possibilitando a manutenção da hidratação das plantas, evitando-se o transporte reverso de água em direção ao meio externo, principalmente na presença do Ca. Além disso, os resultados deste trabalho mostraram que a o Ca melhora a hidratação das folhas no clone de eucalipto VM01 após a permanência das plantas por um período de tempo maior sob restrição hídrica.

O Ca é um nutriente importante no aumento da tolerância das plantas à seca (Naeem et al., 2018; Leng et al., 2020). Neste estudo ao término do experimento, as plantas de eucalipto cultivadas na presença de Ca e restrição hídrica apresentaram valores maiores de Ψ_w quando comparadas às plantas com omissão de Ca, dentro do mesmo tempo de avaliação. Isso indica o efeito mitigador deste nutriente no sentido de otimizar a absorção e/ou uso da água favorecendo a hidratação das plantas.

O Ψ_w de células vegetais é a principal força motriz para o transporte de água das raízes para as folhas, sendo uma boa referência do status hídrico das plantas (Levitt, 1980; Parkash and Singh, 2020). O acúmulo de substâncias de ajuste osmótico nas raízes de plantas submetidas à seca reduz o potencial hídrico radicular, aumentando a absorção de água (Chaves et al., 2003). Já na parte aérea, o aumento dessas substâncias favorece a hidratação dos tecidos (Warren et al., 2012). O aumento da turgescência das células devido ao acúmulo de substâncias

osmorreguladoras, ocasiona maior potencial de pressão nas células, favorecendo o aumento do potencial hídrico (Blum, 2017). A maior hidratação das plantas cultivadas sob restrição hídrica e presença de Ca, observadas no T3 no nosso estudo, pode ser devido à maior capacidade de ajuste osmótico nessas condições. Estudos relatam que o Ca possui capacidade de melhorar o status hídrico de diversas culturas através da síntese de substâncias de osmorregulação, aumentando a capacidade de retenção de água (Merchant et al., 2007; Xu et al., 2013; Kang et al., 2017; Xue et al., 2018; Leng et al., 2020).

A diversificação no padrão de expressão das diferentes isoformas das AQP nas raízes pode permitir respostas diferenciadas das plantas às mudanças ambientais (Zargar et al., 2017a). Em situações de disponibilidade hídrica variável, as AQP, em especial a subfamília das PIP, são as principais facilitadoras do transporte de água das células (Maurel et al., 2015a; Yaneff et al., 2015). A expressão das AQP nas raízes é finamente regulada em situações de déficit hídrico, e está intimamente relacionada com a intensidade e duração do estresse (Alexandersson et al., 2005; Afzal et al., 2016; Zargar et al., 2017a)

A regulação positiva das PIP nas raízes é importante no aumento da permeabilidade da membrana e no transporte de água para as células, mantendo a hidratação dos tecidos e a normalidade dos processos fisiológicos (Zargar et al., 2017b; Paudel et al., 2019). Neste estudo, no primeiro tempo de amostragem (T1), a restrição hídrica promoveu aumento da expressão gênica da maioria das PIP estudadas, independentemente da disponibilidade de Ca. Isso indica a importância dessas proteínas no aumento da absorção de água, quando as plantas percebem o estresse. O aumento das expressões de *PIP1;2*, *PIP2;1*, *PIP2;2* e *PIP2;7* é uma resposta direta das plantas do clone de eucalipto VM01 à restrição hídrica, e demonstra sua grande eficiência e rapidez em ativar os mecanismos mitigatórios para otimização da captação de água. Resultados semelhantes foram observados em raízes de *Phaseolus vulgaris* cultivados sob privação de água (Aroca et al., 2006) e em raízes de *Zea mays* avaliadas 2 e 8 h após a adição

de PEG na solução de cultivo. Rodrigues et al. (2013) observaram que a expressão de *PIP1* e *PIP2* em raízes de *Eucalyptus grandis* foi regulada positivamente após 6 e 24 h de restrição hídrica pela adição de PEG.

Ao contrário do que foi observado no T1, nos outros tempos de amostragem (T2 e T3) ocorreu a regulação negativa para a maioria das PIP avaliadas no tratamento com restrição hídrica e presença de Ca. Apenas a *PIP1;2* apresentou efeito contrário, tendo maior expressão sob restrição hídrica no T2 e ausência de variação no T3. Em plantas submetidas ao déficit hídrico por períodos de tempo prolongados, a diminuição da permeabilidade da membrana nas células radiculares é uma importante estratégia para evitar a perda de água da raiz para o solo (Maurel et al., 2015a; Afzal et al., 2016). Amrutha et al. (2021) avaliaram a resposta de *Eucalyptus camaldulensis* em condições de déficit hídrico e observaram regulação negativa das PIPs de raízes e folhas após 8 dias de tratamento. Esse padrão também foi observado em *Cucumis melo* L., no qual a imposição do déficit hídrico reduziu a expressão de diferentes isoformas de PIP nas raízes (Lopez-Zaplana et al., 2022).

As plantas cultivadas sob restrição hídrica e ausência de Ca apresentaram regulação positiva nos genes *PIP1,3*; *PIP1;2*; e *PIP2;7* nos T2 e T3, sendo estes resultados opostos aos que foram observados na presença de Ca. O papel do Ca na regulação das AQP envolve processos complexos. Em plantas de *Capsicum annum* submetidas ao estresse salino, Martínez-Ballesta et al. (2008b) observaram que o aumento do Ca citosólico, devido à percepção do estresse, pode ocasionar o fechamento do poro das AQP. Por outro lado, segundo esses autores, o estresse salino reduziu a concentração de Ca nas plantas, e o fornecimento de Ca levou à regulação positiva das AQP. A aplicação de Ca²⁺ em vesículas de membrana plasmática de raízes de *Beta vulgaris* reduziu a permeabilidade à água em até 95% (Allewa et al., 2006). Esses autores relataram que a face citoplasmática das AQP é sensível ao Ca. Esse comportamento também foi observado em *Arabidopsis thaliana*, sugerindo o efeito inibidor do Ca em algumas

aquaporinas (Gerbeau et al., 2002). Além disso, foi observado que cátions divalentes, em especial o Ca^{2+} , são capazes de inibir a atividade de isoformas de PIP em *A. thaliana* (Verdoucq et al., 2008).

5. CONCLUSÕES

De forma geral, os resultados deste trabalho mostraram que o clone de eucalipto VM01 apresenta aumento da expressão das AQP nas raízes quando percebe a seca e reduz à medida que a restrição hídrica se intensifica. Essa é uma estratégia importante para preservar o estado hídrico das plantas sob seca, podendo ser considerado um mecanismo fisiológico de tolerância à seca desse material genético. Além disso, o Ca mostrou desempenhar papel importante na regulação negativa das PIP nas raízes quando expostas ao maior tempo de seca. Mais estudos nessa linha de pesquisa serão necessários para compreender as respostas de outros materiais genéticos na regulação das AQP e a relação com a tolerância à seca.

REFERÊNCIAS

- Afzal Z, Howton TC, Sun Y, Mukhtar MS. The roles of aquaporins in plant stress responses. *J Dev Biol.* 2016;4. <https://doi.org/10.3390/jdb4010009>
- Ahanger MA, Morad-Talab N, Abd-Allah EF, Ahmad P, Hajiboland R. Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrients. *Water Stress Crop Plants A Sustain Approach.* 2016;2-2:649-68. <https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch37>
- Ahmed S, Kouser S, Asgher M, Gandhi SG. Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiol Plant.* 2021;172:1089-105. <https://doi.org/10.1111/ppl.13416>
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol.* 2005;59:469-84. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-0352->
- Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Maurel C, Parisi M, Tyerman SD, Amodeo G. Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *J Exp Bot.* 2006;57:609-21. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERJ046>
- Amrutha S, Parveen ABM, Muthupandi M, Vishnu K, Bisht SS, Sivakumar V, Ghosh Dasgupta M. Characterization of *Eucalyptus camaldulensis* clones with contrasting response to short-term water stress response. *Acta Physiol Plant.* 2021;43:14. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03175-0>
- Barros Leite PR. Papel do cálcio na mitigação dos efeitos da restrição hídrica em eucalipto [tese]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2022.
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A. Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research.* 2016;5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>
- Blum A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant Cell Environ.* 2017;40:4-10. <https://doi.org/10.1111/PCE.12800>
- Carle JB, Duval A, Ashfordc S. The future of planted forests. *Int For Rev.* 2020;22:65-80. <https://doi.org/10.1505/146554820829523970>
- Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Report* 1993 112. 1993;11:113-6. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct Plant Biol.* 2003;30:239-64. <https://doi.org/10.1071/FP02076>
- Clark RB. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. *J Plant Nutr.* 1982;5:1039-57. <https://doi.org/10.1080/01904168209363037>
- Fernandes ET, Cairo PAR, Novaes AB De. Respostas fisiológicas de clones de eucalipto cultivados em casa de vegetação sob deficiência hídrica Physiological responses of eucalyptus clones grown in a greenhouse under water deficit. *Ciência Florest.* 2015;45:29-34. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20120152>

- Gerbeau P, Amodeo G, Henzler T, Santoni V, Ripoche P, Maurel C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* 2002;30:71-81. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2002.01268.X>
- Ghosh Dasgupta M, Dharanishanthi V. Identification of PEG-induced water stress responsive transcripts using co-expression network in *Eucalyptus grandis*. *Gene.* 2017;627:393-407. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.06.050>
- Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D, Chaumont F. Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: A clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol.* 2006;62:305-23. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9022-1>
- Kang J, Zhao W, Zheng Y, Zhang DM, Zhou H, Sun P. Calcium chloride improves photosynthesis and water status in the C4 succulent xerophyte *Haloxylon ammodendron* under water deficit. *Plant Growth Regul.* 2017;82:467-78. <https://doi.org/10.1007/S10725-017-0273-4/TABLES/6>
- Kapilan R, Vaziri M, Zwiazek JJ. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biol Res.* 2018;51. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0152-0>
- Leng X, Xue L, Wang J, Li S, Yang Z, Ren H, Yao X, Wu Z, Li J. Physiological responses of *Handeliendron bodinieri* (Levl.) rehd. to exogenous calcium supply under Drought stress. *Forests.* 2020;11:1-14. <https://doi.org/10.3390/f11010069>
- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. *Responses Plants to Environ Stress Vol II Water, Radiation, Salt, Other Stress.* 1980
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25:402-8. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Locatelli M, Barros NF, Neves JCL, Novais RF. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *Rev Árvore.* 1984;8:53-69.
- Lopez-Zaplana A, Martinez-Garcia N, Carvajal M, Bárzana G. Relationships between aquaporins gene expression and nutrient concentrations in melon plants (*Cucumis melo* L.) during typical abiotic stresses. *Environ Exp Bot.* 2022;195:104759. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2021.104759>
- Martínez-Ballesta MC, Cabañero F, Olmos E, Periago PM, Maurel C, Carvajal M. Two different effects of calcium on aquaporins in salinity-stressed pepper plants. *Planta.* 2008a;228:15-25. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0714-4>
- Martins GS, Freitas NC, Máximo WPF, Paiva LV. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *J Plant Physiol.* 2018;229:122-31. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.07.007>
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L. Aquaporins in plants. *Physiol Rev.* 2015a;95:1321-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>
- Merchant A, Callister A, Arndt S, Tausz M, Adams M. Contrasting Physiological Responses of

- Six Eucalyptus Species to Water Deficit. *Ann Bot.* 2007;100:1507-15. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm234>
- Naeem M, Naeem MS, Ahmad R, Ihsan MZ, Ashraf MY, Hussain Y, Fahad S. Foliar calcium spray confers drought stress tolerance in maize via modulation of plant growth, water relations, proline content and hydrogen peroxide activity. *Arch Agron Soil Sci.* 2018;64:116-31. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1327713>
- Paquette A, Messier C. The role of plantations in managing the world's forests in the Anthropocene. *Front Ecol Environ.* 2010;8:27-34. <https://doi.org/10.1890/080116>
- Parkash V, Singh S. A Review on Potential Plant-Based Water Stress Indicators for Vegetable Crops. *Sustain* 2020, Vol 12, Page 3945. 2020;12:3945. <https://doi.org/10.3390/SU12103945>
- Patel J, Mishra A. Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture and photosynthesis. *Physiol Plant.* 2021:ppl.13324. <https://doi.org/10.1111/ppl.13324>
- Paudel I, Gerbi H, Zisovich A, Sapir G, Ben-Dor S, Brumfeld V, Klein T. Drought tolerance mechanisms and aquaporin expression of wild vs. cultivated pear tree species in the field. *Environ Exp Bot.* 2019;167:103832. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2019.103832>
- Payn T, Carnus JM, Freer-Smith P, Kimberley M, Kollert W, Liu S, Orazio C, Rodriguez L, Silva LN, Wingfield MJ. Changes in planted forests and future global implications. *For Ecol Manage.* 2015;352:57-67. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2015.06.021>
- Perrone I, Gambino G, Chitarra W, Vitali M, Pagliarani C, Riccomagno N, Balestrini R, Kaldenhoff R, Uehlein N, Gribaudo I, Schubert A, Lovisolo C. The grapevine root-specific aquaporin VvPIP2;4N controls root hydraulic conductance and leaf gas exchange under well-watered conditions but not under water stress. *Plant Physiol.* 2012;160:965-77. <https://doi.org/10.1104/pp.112.203455>
- Pinto SI do C, Neto AEF, Neves JCL, Faquin V, Moretti B da S. Eficiência nutricional de clones de eucalipto na fase de mudas cultivadas em solução nutritiva. *Rev Bras Ciência Do Solo.* 2011; 35:523-533
- Rodrigues MI, Bravo JP, Sasaki FT, Severino FE, Maia IG. The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. *Plant Sci.* 2013;213:106-13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.005>
- Santos EF, Mateus NS, Rosário MO, Garcez TB, Mazzafera P, Lavres J. Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. *Physiol Plant.* 2020:ppl.13228. <https://doi.org/10.1111/ppl.13228>
- Scharwies JD, Dinneny JR. Water transport, perception, and response in plants. *J Plant Res.* 2019;132:311-24. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01089-8>
- Sedjo RA. The potential of high-yield plantation forestry for meeting timber needs: Recent performance, future potentials, and environmental implications. *New For.* 1999;17:339-59. <https://doi.org/10.1023/a:1006563420947>

- Shekoofa A, Sinclair TR. Aquaporin Activity to Improve Crop Drought Tolerance. *Cells* 2018, Vol 7, Page 123. 2018;7:123. <https://doi.org/10.3390/CELLS7090123>
- Singh RK, Deshmukh R, Muthamilarasan M, Rani R, Prasad M. Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant Physiol Biochem*. 2020a;149:178-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.009>
- Souza NF. Genótipos de eucalipto tolerantes à seca apresentam maior capacidade de absorção e eficiência de uso de cálcio? [tese]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2019.
- Šurbanovski N, Grant OM. The Emerging Role of Aquaporins in Plant Tolerance of Abiotic Stress. *Emerg Technol Manag Crop Stress Toler*. 2014;2:431-47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00018-1>
- Verdoucq L, Grondin A, Maurel C. Structure–function analysis of plant aquaporin AtPIP2;1 gating by divalent cations and protons. *Biochem J*. 2008;415:409-16. <https://doi.org/10.1042/BJ20080275>
- Wang M, Ding L, Gao L, Li Y, Shen Q, Guo S. The interactions of aquaporins and mineral nutrients in higher plants. *Int J Mol Sci*. 2016;17. <https://doi.org/10.3390/ijms17081229>
- Warren CR, Aranda I, Cano FJ. Metabolomics demonstrates divergent responses of two Eucalyptus species to water stress. *Metabolomics*. 2012;8:186-200. <https://doi.org/10.1007/S11306-011-0299-Y/FIGURES/5>
- Wu Y, Liu X, Wang W, Zhang S, Xu B. Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions. *Plant Physiol Biochem*. 2012;58:212-9. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.005>
- Xu C, Li X, Zhang L. The Effect of Calcium Chloride on Growth, Photosynthesis, and Antioxidant Responses of *Zoysia japonica* under Drought Conditions. *PLoS One*. 2013;8:e68214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068214>
- Xue L, Ren H, Long W, Leng X, Wang J, Yao X, Li S. Ecophysiological Responses of *Calcicole Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst. to Drought Stress and Calcium Supply. *For* 2018, Vol 9, Page 667. 2018;9:667. <https://doi.org/10.3390/F9110667>
- Yaneff A, Vitali V, Amodeo G. PIP1 aquaporins: Intrinsic water channels or PIP2 aquaporin modulators? *FEBS Lett*. 2015;589:3508-15. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2015.10.018>
- Zargar SM, Nagar P, Deshmukh R, Nazir M, Wani AA, Masoodi KZ, Agrawal GK, Rakwal R. Aquaporins as potential drought tolerance inducing proteins: Towards instigating stress tolerance. *J Proteomics*. 2017a;169:233-8. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.010>