

PATRICIA RAMALHO DE BARROS

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS INICIAIS DE CLONES DE
EUCALIPTO AO ESTRESSE OSMÓTICO EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2018

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

T

B277r
2018
Barros, Patricia Ramalho de, 1993-
Respostas morfofisiológicas iniciais de clones de eucalipto
ao estresse osmótico em sistema hidropônico / Patricia Ramalho
de Barros. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 28 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nairam Félix de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 20-28.

1. Eucalipto - Cultivo. 2. Eucalipto -Melhoramento
genético. 3. Eucalipto - Efeito da seca. 4. Estresse hídrico.
5. Hidroponia. 6. Eucalipto - Fisiologia. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Solos. Programa de Pós-Graduação
em Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.

CDD 22. ed. 634.973766

PATRICIA RAMALHO DE BARROS

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS INICIAIS DE CLONES DE EUCALIPTO AO
ESTRESSE OSMÓTICO EM SISTEMA HIDROPÔNICO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.



Samuel Cordeiro Vitor Martins



Genelício Crusoé Rocha



Alice Pita Barbosa
(Coorientadora)



Nairam Félix de Barros
(Orientador)

"O coração do homem traça seu caminho, mas o
Senhor lhe dirige os passos."

Provérbios 16.9

"Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem
condições melhores para fazer melhor ainda!"

Mário Sérgio Cortella

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me conduzir, proteger, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me dando saúde e perseverança para jamais desistir dos meus sonhos.

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

Ao professor Nairam Félix de Barros, pela orientação, conselhos, ensinamentos e por toda paciência e ajuda durante a realização desse trabalho.

Ao professor Júlio César Lima Neves, pela coorientação e pelo grande incentivo para a realização do meu mestrado. Além dos conselhos, ensinamentos e apoio incondicional na realização desse trabalho.

Aos membros da banca de avaliação desta dissertação, Samuel C. Vitor Martins e Genelício Crusoé Rocha.

À Dra. Alice Pita Barbosa, pela coorientação, conselhos, críticas, ensinamentos, amizade e pela disposição em ajudar.

A todos os professores e funcionários que contribuíram para a minha formação.

Ao meu pai, Camilo, e minha mãe, Ana Lúcia, que me ensinaram a importância de conquistar os nossos sonhos por meio do esforço próprio, com sabedoria, humildade e dedicação. Por serem meus maiores exemplos e me mostrarem que mesmo com todas as dificuldades da vida é possível chegar onde sonhamos. Obrigada, mãe, por todas as orações, por todo carinho e cuidado. Obrigada, pai, por ser meu exemplo de força e coragem.

Ao meu irmão Paulo César, pela amizade, pelas caronas, companheirismo e por tornar meus dias mais alegres quando estamos juntos. Você é muito importante na minha vida!

Ao Rodrigo, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Pelo companheirismo, amor e cuidado.

Ao Domingos e Leoneza, por todo cuidado e amor durante todos esses anos em Viçosa.

Aos meus tios Maria das Graças Barros Rocha e Danilo Rocha, por me incentivarem a estudar e por toda a ajuda no início da minha caminhada.

Aos colegas do DPS, por toda amizade e pelos bons momentos vividos durante esse período do mestrado.

À Bruna por todos os momentos de alegrias que vivemos diariamente na nossa casinha. Por se tornar uma irmã pra mim.

À Dra. Nathalia Silva pela amizade e por toda ajuda na realização desse trabalho.

Ao Rafael Martins pela ajuda na condução do experimento.

Enfim, a todos que verdadeiramente torceram por mim, e de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste curso.

BIOGRAFIA

PATRICIA RAMALHO DE BARROS, filha de Camilo Soares de Barros e Ana Lúcia Ramalho de Barros, natural de Senador Firmino, Minas Gérias, nasceu no dia 18 de maio de 1993.

Em março de 2011 iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa, onde graduou-se em janeiro de 2016. Durante a graduação foi bolsista voluntária durante seis meses e posteriormente bolsista de iniciação científica da CNPq durante três anos, atuando na área de fertilidade do solo e nutrição de plantas, com o gênero *Eucalyptus*.

Em março de 2016 ingressou no programa de Pós- Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 19 de fevereiro de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. HIPÓTESE	3
4. Material e métodos.....	3
4.1. Condições experimentais.....	3
4.2. Potencial hídrico na antemanhã (ψ_w).....	4
4.3. Massa de matéria seca	4
4.4. Quantificação de nutrientes e determinação da eficiência nutricional	4
4.5. Trocas gasosas	5
4.6. Fluorescência da clorofila a.....	5
4.7. Aldeído malônico (MDA)	6
4.10. Análises estatísticas	7
5. RESULTADOS.....	7
5.1. Hidratação das plantas	7
5.2. Sintomas e crescimento	8
5.3. Aspectos nutricionais	9
5.4. Fotossíntese	11
5.5. Estresse oxidativo.....	13
6. DISCUSSÃO.....	14
7. CONCLUSÕES	19
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

RESUMO

BARROS, Patricia Ramalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Respostas morfofisiológicas iniciais de clones de eucalipto ao estresse osmótico em sistema hidropônico.** Orientador: Nairam Félix de Barros. Coorientadores: Alice Pita Barbosa e Júlio César Lima Neves.

O cultivo de eucalipto é uma atividade de grande importância econômica no Brasil. Devido à grande demanda da indústria florestal, esses cultivos tem sido realizados de modo crescente em regiões onde as restrições hídricas são bastante acentuadas, tendo como resultado plantas menos produtivas e maiores taxas de mortalidade das árvores. Uma solução deste problema é a utilização de clones mais tolerantes à seca. Apesar de já se terem identificados clones bastante tolerantes, as características da planta que conferem tal tolerância ainda não foram bem elucidadas. Além disso, muitos clones tolerantes são pouco produtivos, o que inviabiliza o seu uso. Portanto, a identificação de características anatômicas, fisiológicas e moleculares que conferem maior tolerância à seca é de suma importância para a seleção de clones tolerantes e produtivos. O objetivo deste trabalho foi identificar caracteres morfofisiológicos potencialmente associados à maior tolerância de clones de *Eucalyptus* spp. ao déficit hídrico. Foram utilizadas mudas dos clones I-144 e GG100, de maior e menor tolerância ao déficit hídrico, respectivamente. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em sistema de cultivo hidropônico, utilizando-se solução nutritiva de Clark com potencial osmótico (Ψ_s) em torno de -0.05 MPa (controle), por 30 dias, para aclimação. Após esse período, as plantas foram separadas em dois grupos: metade permaneceu sob condição controle e a outra metade foi submetida à restrição hídrica, induzida pela redução do potencial osmótico do meio externo para -0,65 MPa, utilizando-se polietileno glicol 6000. As avaliações foram realizadas após seis dias, e incluíram a determinação de variáveis associadas à fotossíntese, nutrição, crescimento e estresse oxidativo. As plantas de ambos os clones, sob restrição hídrica, apresentaram sintomas de estresse hídrico: folhas de coloração mais escurecida, com aspecto murcho e margens e ápices necróticos; raízes de coloração marrom escuro, oriunda da ocorrência de estresse oxidativo e de prejuízos à fotossíntese. O clone I-144 apresentou maior produção de biomassa radicular em detrimento da parte aérea, bem como maiores conteúdos de B e Ca na raiz. Os teores de aldeído malônico, indicador de estresse oxidativo, aumentaram nas folhas e raízes de ambos os clones após o tratamento, sendo este aumento mais

expressivo no clone GG100. O clone I-144 se mostrou mais tolerante à seca em relação ao clone GG100.

ABSTRACT

BARROS, Patricia Ramalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Initial morphophysiological responses of eucalyptus clones to osmotic stress in a hydroponic system.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Alice Pita Barbosa and Júlio César Lima Neves.

Eucalyptus cultivation plays an important economic role in Brazil. Because of the great demand by the forest industry, this crop has been increasingly planted in regions where water restrictions are very high, leading to low productivity and high tree mortality rates. A solution to this problem is the use of drought-tolerant genotypes. Although fairly tolerant clones have already been identified, the characteristics that provide this tolerance have not yet been well elucidated. In addition, many tolerant clones are not very productive, which makes their use unfeasible. Therefore, the identification of the anatomical, physiological and molecular characteristics responsible for higher tolerance to drought is very important to assist the selection of drought-tolerant and productive clones. The aim of this work was to identify morphophysiological characters potentially associated with greater tolerance to drought in *Eucalyptus* clones. Seedlings of the clones I-144 and GG100 were used, bearing higher and lower drought tolerance, respectively. The experiment was carried out under greenhouse conditions using Clark's nutrient solution with osmotic potential (Ψ_s) set around -0.05 MPa (control) for 30 days, for acclimatization. Subsequently, the seedlings were separated into two groups: half of the seedlings remained under the control condition and the other half was submitted to water restriction induced by reducing the osmotic potential to -0.65 MPa by the use of polyethylene glycol 6000. At the seventh day, the seedlings were evaluated to determine the variables associated with photosynthesis, nutrition, growth and oxidative stress. The results showed that seedlings of both clones under water restriction presented symptoms of water stress: darker leaves, wilting and necrotic leaf borders and tip; dark-brown roots, associated with the occurrence of oxidative stress, as well as losses in photosynthesis. The clone I-144 showed higher root biomass production in detriment of aerial part, as well as higher B and Ca contents in the roots. The levels of malondialdehyde, an indicator of oxidative stress, increased in the leaves and roots of both clones after the treatment, being more expressive in clone GG100. The clone I-144 showed to be more drought tolerant than clone GG100.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos florestais, tais como carvão e celulose, tanto no Brasil como no exterior, tem levado à expansão das áreas com florestas plantadas. No ano de 2016 a área total de árvores plantadas no Brasil totalizou 7,8 milhões de hectares, sendo 5,7 milhões somente de plantios de eucalipto (Ibá, 2017). Devido ao seu rápido crescimento e alta produtividade, o eucalipto tem sido plantado em escala cada vez maior para atender a demanda por produtos florestais na maioria dos estados brasileiros (Rezende et al., 2013).

Nos últimos cinco anos, o crescimento da área cultivada com eucalipto foi de 2,4% ao ano, sendo Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul os estados com a maior área plantada. O estado de Minas Gerais é responsável por 24% dos plantios, sendo que grande parte da área plantada está localizada em regiões onde as limitações hídricas são intensas (Ibá, 2017). Dentre os diversos agentes promotores de estresses ambientais, a deficiência hídrica é considerada a mais limitante à produtividade do eucalipto nas regiões tropicais (Ryan et al., 2010), superando as deficiências nutricionais (Stape et al., 2010).

No Brasil, o eucalipto tem sido cultivado em solos de baixa fertilidade natural (Barros et al., 1981), ocasionando deficiências nutricionais nas plantas, que se acentuam em situações de restrição hídrica (Sakya et al., 2002; Ramos et al., 2009). A seca prejudica a absorção de vários nutrientes, principalmente aqueles cujo movimento no solo se dá por fluxo de massa, sendo o desbalanço nutricional um efeito aditivo à seca em plantas (Silva, 2017). Estudos demonstram a importância de determinados nutrientes na mitigação dos efeitos causados pela seca (Nunes, 2010; Reis, 2011; Barros Filho, 2014; Hodecker et al., 2014; Hodecker, 2015). Nutrientes como o boro (B), cálcio (Ca) e potássio (K) tem se mostrado importantes na atenuação dos danos causados pela seca; por isso, uma boa nutrição mineral é frequentemente relatada como essencial para a expressão da tolerância à seca (Battie-Laclau et al., 2014; Corrêa et al., 2017; Müller et al., 2017; Naeem et al., 2018).

De forma geral, a baixa disponibilidade de água no solo impõe estresse à planta, promovendo alterações moleculares, fisiológicas, anatômicas e morfológicas. Uma das primeiras respostas fisiológicas à restrição hídrica é o fechamento estomático, como forma de evitar perdas excessivas de água via transpiração. A redução da abertura estomática favorece a manutenção da hidratação dos tecidos, por reduzir a transpiração,

mas isso acarreta perdas da produtividade, devido a diminuição das taxas fotossintéticas (Anjum et al., 2011).

Sob condições de déficit hídrico moderado, a resposta estomática representa a principal causa da redução da fotossíntese, em razão da diminuição da difusão do CO₂ para os sítios de carboxilação da enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCO) (Warren et al., 2011). Em casos de seca mais severa observa-se queda da eficiência do ciclo de Calvin e consequente emparelhamento de elétrons na cadeia respiratória, o qual resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar danos celulares, como a peroxidação de lipídios de membrana (Tardieu François e Thierry, 1998; Fu e Huang, 2001; Ahmed et al., 2009). Entretanto, há genótipos que permitem abertura parcial dos estômatos, evitando perda excessiva de água, mas mantendo a concentração interna de CO₂ e, consequentemente, a taxa fotossintética (Condon et al., 2004).

O estresse hídrico causado pela seca comumente ocasiona redução da área foliar (um importante mecanismo contra perdas excessivas de água, mas que afeta a produtividade) e aumento do direcionamento de fotoassimilados para a raiz, promovendo seu crescimento, o que facilita o acesso à água em camadas mais profundas do solo (Anjum et al., 2011). No entanto, isso reduz o crescimento da parte aérea e a produção de madeira. Além disso, o aumento da alocação de fotoassimilados na raiz, resultando em maior produção de biomassa radicular em detrimento da parte aérea, é uma resposta à seca frequentemente observada em plantas tolerantes, por aumentar a eficiência na aquisição de água e nutrientes (Costa e Silva et al., 2004; Valdés et al., 2013).

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). Dentre os clones de eucalipto mais utilizados no Brasil estão I-144 e GG100, híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. O clone I-144, considerado mais tolerante à seca, é menos produtivo, enquanto o GG100 é menos tolerante, porém, mais produtivo sob condições de boa disponibilidade hídrica (Barros Filho, 2014; Pita-Barbosa et al., 2016; Müller et al., 2017).

No Brasil, a maioria dos trabalhos de melhoramento genético do eucalipto visa obter maiores taxas de crescimento e produtividade das fibras (Navarrete-Campos et al., 2013), não considerando as respostas morfológicas e bioquímicas das árvores ao estresse hídrico e a influência dos nutrientes nesses processos. Apesar de clones relativamente tolerantes terem sido identificados, os fatores que conferem melhor

performance sob seca ainda não foram bem elucidados. Portanto, a identificação de mecanismos fisiológicos e moleculares responsáveis pela maior tolerância à seca é de suma importância para os avanços das pesquisas que visam à produção de clones tolerantes e produtivos.

2. OJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar caracteres morfofisiológicos associados à maior tolerância ao déficit hídrico nos clones de *Eucalyptus* GG100 e I-144, amplamente cultivados no Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar o crescimento dos clones sob restrição hídrica e identificar sintomas macroscópicos de estresse hídrico;
- Determinar os efeitos da restrição hídrica sobre a partição de nutrientes nas plantas e atividade fotossintética;
- Detectar a ocorrência de estresse oxidativo e sua intensidade, nos diferentes clones.

3. HIPÓTESE

O clone I-144 apresentará menor nível de estresse oxidativo e maior crescimento radicular, em relação ao clone GG100.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições experimentais

Foram utilizadas mudas com 90 dias de idade dos clones I-144 e GG100, de maior e menor tolerância ao déficit hídrico, respectivamente. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos de polietileno (8 L), e as mudas foram aclimatadas em solução nutritiva de Clark (Clark, 1982), sob aeração constante e pH de 5,8 por 30 dias. Após o período de aclimação, as plantas foram separadas em dois grupos: metade permaneceu sob potencial hídrico (ψ_w) em torno de -0,05 MPa (controle) e a outra metade foi submetida à restrição hídrica (induzida através da redução do potencial osmótico da solução), realizada pela adição gradativa de polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) para a obtenção do potencial de -0,65 MPa,

simulando condições de campo, onde há uma redução gradativa da disponibilidade de água no solo na ausência de chuvas. As plantas permaneceram por três dias no tratamento com -0,3 MPa e por mais três dias no tratamento com -0,65 MPa, sendo a coleta realizada após seis dias de submissão ao estresse. Dessa forma, o experimento constituiu um fatorial 2 x 2 (clones x ausência/presença de déficit hídrico), em delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições.

4.2. Potencial hídrico na antemanhã (ψ_w)

O potencial hídrico foliar (ψ_w) foi determinado no período de antemanhã, por volta das 2 h da madrugada após seis dias de submissão ao estresse em folhas pertencentes ao terceiro entrenó, utilizando uma câmara de pressão semelhante à idealizada por Scholander et al. (1965) (Model 3000F01 Plant Water Status Console; Soil Moisture Equipment Corp. Santa Barbara, CA, USA).

4.3. Massa de matéria seca

Ao final do experimento, a parte aérea e o sistema radicular foram coletados separadamente. As raízes foram lavadas com água destilada, para a remoção do PEG e elementos adsorvidos à sua superfície, e cuidadosamente secas com papel absorvente. Foi realizada a pesagem da massa fresca da parte aérea e do sistema radicular. Feito isso, amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para uma estufa de circulação de ar forçado, à temperatura de 65 °C, por 72 horas, até atingir peso constante. Após esse período, as amostras foram pesadas para a obtenção da massa de matéria seca.

4.4. Quantificação de nutrientes e determinação da eficiência nutricional

Após secagem, amostras de parte aérea e raízes foram moídas em moinho tipo Wiley, passadas em peneira com malha de 0,5 mm e submetidas à digestão nitroperclórica para a determinação da concentração de P, K, S, Ca, Mg, Mn, Cu e Fe por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES). O teor de B foi quantificado por colorimetria.

Foi determinado o conteúdo dos elementos na raiz e parte aérea das plantas, calculado pelo produto entre o teor de nutrientes e a massa de matéria seca do compartimento vegetal. Calcularam-se, também, os seguintes parâmetros de eficiência

nutricional dos clones, para cada um dos nutrientes citados: eficiência de absorção (EA), expressa pela divisão do conteúdo do nutriente na planta por massa de matéria seca da raiz (Swiader et al., 1994); eficiência de translocação (ET), dividindo-se o conteúdo do nutriente na parte aérea pelo conteúdo do nutriente na planta inteira (Li et al., 1991); eficiência de utilização dos nutrientes na parte aérea (EUPA), dividindo-se o quadrado da matéria seca da parte aérea pelo conteúdo do nutriente na parte aérea; e a eficiência de utilização nas raízes (EUR), pelo quadrado da massa de matéria seca das raízes dividido pelo conteúdo do nutriente das raízes (Siddiqi e Glass, 1981).

4.5. Trocas gasosas

Os valores de 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; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas no período da manhã em folhas completamente expandidas do terceiro nó, após seis dias de submissão ao déficit hídrico (entre 08:00 e 12:30 h), utilizando radiação fotossinteticamente ativa constante ($1400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 , temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade em torno de 65 %. As medi\u00e7\u00f5es foram efetuadas por bloco para reduzir o efeito do hor\u00e1rio da avalia\u00e7\u00e3o sobre as respostas fotossint\u00e9ticas.

4.6. Fluoresc\u00eancia da clorofila a

A determina\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia da clorofila a foi realizada com o intuito de identificar danos ao fotossistema II do aparato fotossint\u00e9tico, nas mesmas folhas selecionadas para as an\u00e1lises de trocas gasosas, com aux\u00edlio de um analisador de g\u00e1s infravermelho com fluor\u00f4metro acoplado (IRGA, Licor 6400xt, Lincoln , USA). As folhas foram aclimatadas ao escuro e submetidas \u00e0 determina\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia inicial (F_0) e fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) da clorofila a , possibilitando o c\u00e1lculo do rendimento qu\u00e2ntico potencial do fotossistema II (FSII), em que $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty et al., 1989). As medi\u00e7\u00f5es referentes \u00e0 fase lenta de indu\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia foram feitas com a aplica\u00e7\u00e3o de uma ilumina\u00e7\u00e3o act\u00ednica e um pulso de luz act\u00ednica saturante para a obten\u00e7\u00e3o das seguintes caracter\u00edsticas: fluoresc\u00eancia em amostra adaptada \u00e0 luz antes do pulso de satura\u00e7\u00e3o (F) e fluoresc\u00eancia m\u00e1xima em amostra adaptada \u00e0 luz (F_m'). Com os valores dessas caracter\u00edsticas, foi calculada a fluoresc\u00eancia m\u00ednima do tecido vegetal

iluminado (F_0'), em que $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0 / F_m) + (F_0 / F_m)']$ (Oxborough e Baker, 1997), sendo este utilizado para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do fotossistema II, por meio da fórmula: $qL = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') * (F_0' / F)$ (Kramer et al., 2004).

Na obtenção das formas de dissipação de energia, foram utilizados os modelos descritos por Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004):

$\hat{Y}_{II} = (F_m' - F) / F_m'$ - rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no FSII;

$\hat{Y}_{NPQ} = (F / F_m') - (F / F_m)$ - rendimentos quânticos da dissipação de energia regulada;

$\hat{Y}_{NO} = F / F_m$ - dissipação de energia não regulada.

4.7. Aldeído malônico (MDA)

A quantificação de aldeído malônico (MDA) foi realizada com o objetivo de determinar a ocorrência e a intensidade do estresse oxidativo nas plantas (Hodges et al., 1999), de acordo com a metodologia descrita por Gomes-Júnior et al. (2006), com algumas adaptações. Aproximadamente 50 mg de folhas e 100 mg de raízes foram homogeneizados com 2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 %. Os extratos obtidos foram centrifugados por 15 min a 10000 g, 4 °C. Foram coletados 0,5 mL do sobrenadante, em dois tubos diferentes, sendo um para a reação e outro para o branco da amostra. Aos tubos de reação foi adicionado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 %, preparado em TCA 20 %. Aos tubos contendo o branco da reação foi adicionado somente 1,5 mL de TCA 20 %. Os tubos foram mantidos a 95°C por 30 minutos e as reações foram paralisadas colocando-se os tubos no gelo. Após o resfriamento, o conteúdo foi centrifugado durante 4 min a 10000 g.

A concentração de MDA foi determinada pela leitura das absorvâncias do produto final a 440, 532 e 600 nm. Para o cálculo da concentração de MDA, foi descontada a diferença entre os valores de 532 e 600 nm dos mesmos valores obtidos pela reação sem adição de TBA, como segue: $A = (Abs_{532+TBA}) - (Abs_{600+TBA}) - (Abs_{532-TBA}) - (Abs_{600-TBA})$. Posteriormente, foi descontado o interferente de leitura a 440 nm: $B = (Abs_{440+TBA}) - (Abs_{600+TBA}) \times 0,0571$. A partir das estimativas de A e B, a concentração de MDA foi quantificada pela equação: $MDA (nmol mL^{-1}) = (A - B / 157000) \times 10^6$ (Heath e Packer, 1968). A concentração de MDA foi expressa em

função da massa de matéria seca de cada amostra, a qual foi obtida e convertida a partir dos dados de biomassa.

4.10. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os tratamentos “controle” e “restrição hídrica” comparados pelo teste de F ao nível de 5 e a 10% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1. Hidratação das plantas

O potencial hídrico foliar na antemanhã confirmou que as plantas cultivadas em solução nutritiva com o potencial de $-0,65$ MPa apresentavam restrição hídrica nos tecidos, uma vez que houve grande redução nos valores das plantas controle em relação às submetidas ao tratamento. Os valores observados nos controles, em torno de $-0,3$ MPa, são indicativos de plantas que se encontram com nível adequado hidratação (Figura 1).

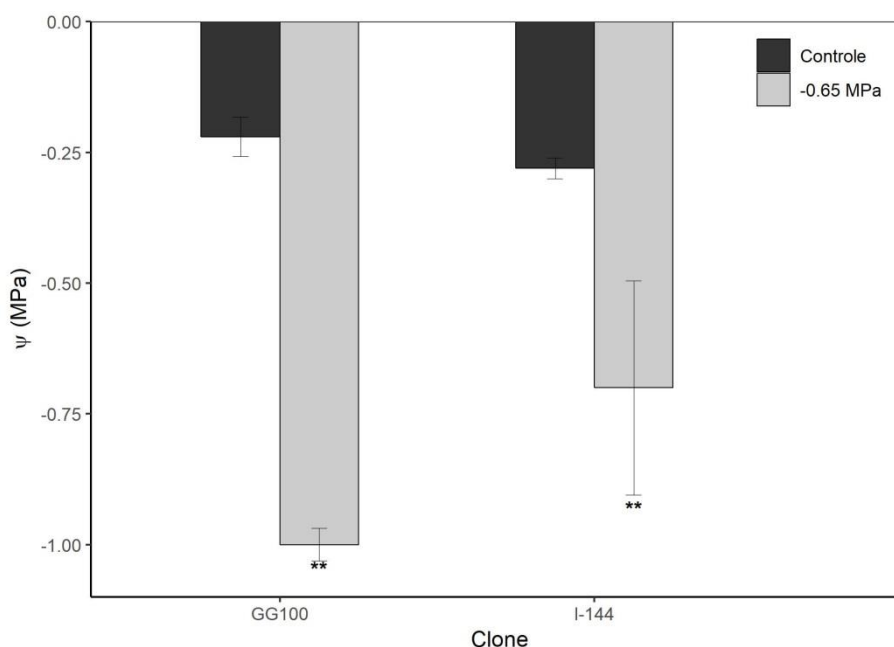


Figura 1. Potencial hídrico foliar na antemanhã de clones de eucalipto (GG100 e I-144) submetidos ao potencial de $-0,65$ MPa, após seis dias de submissão ao tratamento. Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos com restrição hídrica acompanhadas pelo símbolo ** diferem de seus respectivos controles, pelo teste F, em nível de 5% de significância.

5.2. Sintomas e crescimento

As folhas de ambos os clones apresentaram sintomas de deficiência hídrica, como murcha, bordas e ápices necróticos, aspecto retorcido e ressecado e área foliar aparentemente reduzida, em relação ao controle. Além disso, as folhas e as raízes adquiriram coloração mais escurecida (Figura 2).

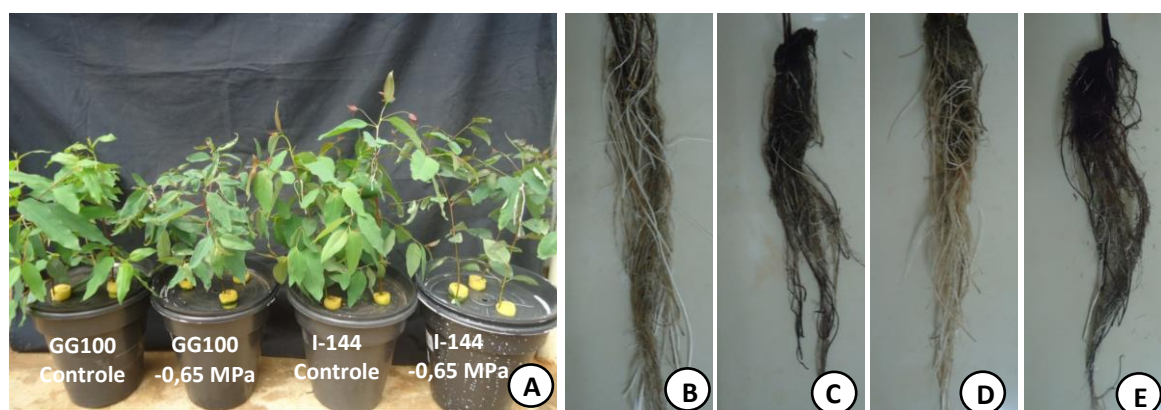


Figura 2. Sintomas em mudas de clones de eucalipto (GG100 e I-144) submetidos ao potencial de -0,65 MPa, em sistema hidropônico, após seis dias de submissão ao tratamento. **A.** Efeitos na parte aérea. **B – E.** Efeitos no sistema radicular. **B.** Clone GG100 (controle). **C.** Clone GG100 (- 0,65 MPa). **D.** Clone I-144 (controle). **E.** Clone I-144 (- 0,65 MPa).

As mudas de ambos os clones mostraram tendência de redução da massa de matéria seca (MS) da parte aérea quando submetidas à restrição hídrica (Tabela 1). A redução não foi significativa, entretanto, as diferenças relativas de massa dos vários componentes das plantas do clone I-144 foram maiores quando submetidas à restrição hídrica do que as do GG100 (Tabela 1). Essa maior sensibilidade do I-144 foi expressa por redução de 21% da massa da parte aérea, enquanto o GG100 apresentou redução de apenas 6%. Por outro lado, a restrição hídrica levou o I-144 a um aumento de 12,7% na massa de matéria seca do sistema radicular no espaço de seis dias de estresse, ao passo que o GG100 teve um aumento de cerca de 3%. A maior reação do I-144 foi refletida na relação entre parte aérea/raízes, exibindo em condição de restrição hídrica, uma redução de 36% nesta relação quando comparado com o tratamento controle.

Tabela 1. Produção de massa de matéria seca da parte aérea (MSPA), do sistema radicular (MSR), da planta inteira (MST) e relação entre a massa de matéria seca da parte aérea e da raiz (MSPA/MSR) de dois clones de eucalipto (GG100 e I-144) submetidos ao potencial de -0,65 MPa por seis dias

Clone	Tratamento	MSPA	MSR	MST	MSPA/MSR
		----- g/planta -----			
GG100	Controle	3,98	1,41	5,39	2,9
	-0,65 MPa	3,74	1,45	5,19	2,81
		(-6,4%)	(+2,8%)	(-3,8%)	(-3%)
I-144	Controle	4,97	1,65	6,62	3,06
	-0,65 MPa	3,92	1,89	5,61	1,96**
		(-21%)	(+12,7%)	(-15%)	(-36%)

** Médias estatisticamente diferentes pelo teste F ao nível de 5% de significância. Os valores entre parêntesis indicam alteração relativa causada pelo potencial de -0,65 MPa em comparação ao controle.

5.3. Aspectos nutricionais

O tratamento -0,65 MPa provocou reduções significativas nos conteúdos de P, K, S e de Fe da parte aérea no clone I-144 de, aproximadamente, 28, 27, 32 e 26% em relação ao controle, respectivamente (Tabela 2). O acúmulo de B, Mn e Ca nas raízes do clone I-144 foi influenciado positivamente pela limitação hídrica, apresentando aumentos de 29, 45 e 60%, respectivamente neste órgão. Já o conteúdo de Cu nas raízes reduziu cerca de 35% em relação ao controle. Além disso, houve reduções nos conteúdos totais de Cu e S após a restrição hídrica. O clone GG100 não apresentou diferenças significativas no conteúdo de nutrientes após o tratamento com limitação hídrica.

Foram observadas reduções significativas nos teores de alguns nutrientes na parte aérea das plantas do clone GG100 submetidas à restrição hídrica (Tabela 3). Houve redução de 15 e 12% nos teores de S e B, respectivamente. Já na parte aérea do clone I-144 houve aumento de 19% no teor de Ca. Em relação ao sistema radicular do clone I-144, a limitação hídrica provocou o aumento de 54 e 18% nos teores de Ca e B, respectivamente, e diminuição de 23% no teor de S e 45% nos teores de Fe e Cu.

Tabela 2. Conteúdo de nutrientes em clones de eucalipto (GG100 e I-144) em respostas ao tratamento -0,65 MPa, imposto por seis dias

Clone	Tratamento	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	B
		mg g ⁻¹					µg g ⁻¹			
Parte aérea										
GG100	Controle	40,86	58,00	31,28	10,14	23,94	59,27	114,65	1041,20	754,69
	-0,65 MPa	37,24	48,96	32,51	9,34	18,93	48,33	108,87	1066,70	633,38
I-144	Controle	56,24	69,92	39,40	14,47	32,65	61,24	142,13	1660,15	839,68
	-0,65 MPa	40,13*	50,99*	36,70	11,02	22,31*	45,04	105,51	*1318,29	668,01
Raiz										
GG100	Controle	9,61	13,24	7,47	6,07	9,51	76,17	41,46	106,78	152,38
	-0,65 MPa	10,35	13,63	11,72	3,44	8,53	80,42	41,66	154,30	138,49
I-144	Controle	11,30	20,62	7,10	4,58	11,71	112,50	47,78	130,87	148,27
	-0,65 MPa	14,94	18,87	17,92**	3,50	10,36	73,36**	52,36	239,01*	207,97**
Total										
GG100	Controle	50,47	71,24	38,75	16,21	33,46	135,44	156,11	1147,99	907,07
	-0,65 MPa	47,59	62,60	44,23	12,78	27,46	128,75	150,53	1221,01	771,88
I-144	Controle	67,55	90,55	46,46	19,06	44,37	173,75	189,91	1791,02	987,95
	-0,65 MPa	55,08	69,86	54,64	14,52	32,67*	118,40**	157,86	1557,30	875,98

** , * : médias estatisticamente diferentes pelo teste F ao nível de 5 ou 10% de probabilidade, respectivamente.

Tabela 3. Teor de nutrientes em clones de eucalipto (GG100 e I-144) submetidos ao tratamento -0,65 MPa por seis dias

Clone	Tratamento	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	B
		mg g ⁻¹					µg g ⁻¹			
Parte aérea										
GG100	Controle	10,03	14,32	7,81	2,51	5,85	14,41	28,73	264,72	190,81
	-0,65 MPa	9,89	13	8,75	2,5	4,96*	12,78	29,19	288,5	168,74*
I-144	Controle	11,5	14,32	7,99	2,91	6,66	12,54	28,64	337,35	169,90
	-0,65 MPa	10,86	13,8	9,9**	2,95	5,99	12,17	28,36*	346,95	177,49
Raiz										
GG100	Controle	6,94	9,53	5,26	3,93	6,82	56,6	29,49	72,7	108,70
	-0,65 MPa	6,92	9,51	7,81*	2,29	5,79	52,62	28,7	95,9	97,16
I-144	Controle	6,94	12,63	4,37	2,66	7,07	70,31	29,1	78,03	89,89
	-0,65 MPa	7,89	10,03	9,46**	1,86	5,47**	38,47**	27,66**	125,42	109,17**

** , * : médias estatisticamente diferentes pelo teste F ao nível de 5 ou 10% de probabilidade, respectivamente.

A eficiência de absorção (EA) de K, Mg, Cu, S e B foi negativamente afetada pela restrição hídrica no clone I-144. Foi detectada redução de 35, 34, 43, 38 e 25% na EA dos elementos supracitados, respectivamente. No clone GG100, somente a EA de B foi reduzida pela restrição hídrica, em 14% (Tabela 4).

Foi detectada redução da eficiência de translocação (ET), no clone I-144, após ser submetido à restrição hídrica. Foi observada redução de 12, 21, 12, 10 e 11% para o P, Ca, Fe, Mn e B, respectivamente. As plantas do clone GG100, submetidas à restrição

hídrica, não apresentaram diferenças significativas para a ET, em relação ao controle (Tabela 4).

No clone I-144, a eficiência de uso dos nutrientes para a produção de parte aérea (EUPA) apresentou redução de 40% e 24% para Ca e Fe, respectivamente, após imposição da restrição hídrica. Sob tais condições, as raízes apresentaram aumento da EUR sob restrição hídrica para o Mg, S e Fe, no clone I-144, e redução para os nutrientes Ca e Mn. No clone GG100, a EUPA e EUR não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Eficiências de absorção, de translocação e de utilização de nutrientes em clones eucalipto (GG100 e I-144) submetidos ao tratamento -0,65 MPa por seis dias

Clone	Tratamento	EA (mg g ⁻¹)					EA (μ g ⁻¹)				
		P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	B	
GG100	Controle	36,39	51,58	28,01	11,24	23,95	99,48	113,28	860,00	667,87	
	-0,65 MPa	35,06	46,03	32,42	9,37	20,15	88,847	110,39	909,79	574,91 **	
I-144	Controle	42,37	56,88	28,79	11,56	27,56	108,72	116,8	1114,8	610,23	
	-0,65 MPa	29,09	36,91*	28,83	7,65**	17,21**	62,340*	83,21	815,01	459,86**	
ET (mg mg⁻¹)											
GG100	Controle	0,80	0,8	0,81	0,68	0,70	0,42	0,73	0,79	0,83	
	-0,65 MPa	0,78	0,78	0,73	0,72	0,68	0,4	0,72	0,75	0,81	
I-144	Controle	0,83	0,77	0,85	0,77	0,74	0,37	0,75	0,81	0,85	
	-0,65 MPa	0,73**	0,73	0,67**	0,75	0,68	0,38	0,66**	0,73**	0,76**	
EUPA (g² mg⁻¹)					EUPA (g² μg⁻¹)						
GG100	Controle	0,397	0,277	0,510	1,581	0,684	0,284	0,138	0,017	0,021	
	-0,65 MPa	0,377	0,288	0,436	1,511	0,752	0,291	0,129	0,014	0,022	
I-144	Controle	0,446	0,362	0,633	1,708	0,760	0,407	0,174	0,015	0,030	
	-0,65 MPa	0,346	0,272	0,377*	1,259	0,620	0,320	0,131*	0,011	0,021	
EUR (g² mg⁻¹)					EUR (g² μg⁻¹)						
GG100	Controle	0,215	0,155	0,275	0,493	0,213	0,027	0,048	0,024	0,013	
	-0,65 MPa	0,206	0,159	0,201	0,651	0,248	0,029	0,050	0,022	0,015	
I-144	Controle	0,245	0,135	0,385	0,608	0,240	0,029	0,057	0,025	0,018	
	-0,65 MPa	0,246	0,196	0,206**	1,055**	0,348*	0,049	0,068*	0,017*	0,018	

** , * : médias estatisticamente diferentes pelo teste F ao nível de 5 ou 10% de probabilidade, respectivamente.

5.4. Fotossíntese

A restrição hídrica promoveu redução na assimilação líquida de carbono (A) nos dois clones estudados (Fig. 3A), sendo a intensidade das respostas ao tratamento bastante similares. Foi observada queda da condutância estomática (g_s) (Fig. 3B) e, conseqüentemente, nas taxas transpiratórias (E) (Fig. 3C), bem como na razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (Fig. 3D), em ambos os clones.

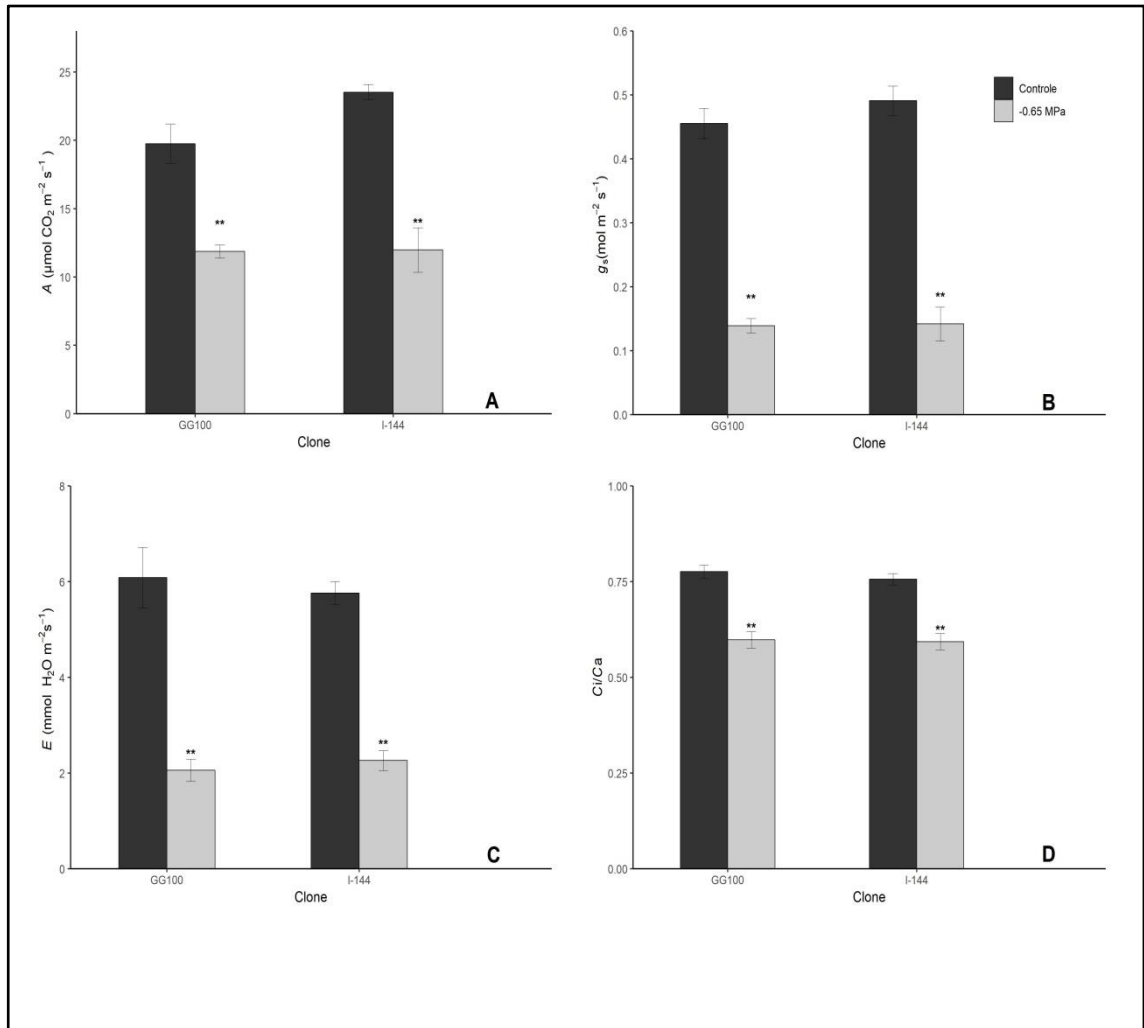


Figura 3. Efeitos da restrição hídrica (- 0,65 MPa) sobre a fotossíntese em dois clones de eucalipto (GG100 e I-144), cultivados em sistema hidropônico por seis dias. **A.** Assimilação de CO_2 (A). **B.** Taxas transpiratórias (E) **C.** Condutância estomática (gs). **D.** Razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a). Barras representam médias \pm erro padrão. Médias de tratamentos com restrição hídrica acompanhadas pelo símbolo ** diferem de seus respectivos controles, pelo teste F, em nível de 5% de significância.

Não foram observadas diferenças significativas no rendimento quântico máximo potencial do fotossistema II (F_v/F_m) entre plantas do controle e aquelas submetidas à restrição hídrica, em ambos os clones, sendo os valores em torno de 0,85. Em ambos os clones, não foram verificadas alterações na taxa de transporte de elétrons (ETR), nos valores de F_0 (quantidade de luz emitida pelas moléculas de chl *a* excitadas, antes da energia ser dissipada para o FSII) e de fluorescência máxima (F_m). Além disso, não foram verificadas alterações nos seguintes parâmetros: \hat{Y}_{II} , que mede a quantidade de energia utilizada na fotossíntese; \hat{Y}_{NO} , que é a dissipação não modulada da energia, na forma de calor e \hat{Y}_{NPQ} , energia dissipada na forma de fluorescência (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros de fluorescência da clorofila *a* de clones de eucalipto (GG100 e I-44) submetidos ao potencial de -0,65 MPa por seis dias

	GG100		I-144	
	Controle	- 0,65 MPa	Controle	- 0,65 MPa
F_0	541,9	553,18	526,72	538,28
F_m	3505,49	3567,05	3457,71	3511,46
F_v/F_m	0,85	0,84	0,85	0,85
F_0'	613,64	604,96	623,56	618,79
F_m'	1573,27	1468,48	1764,99	1517,25
ETR	155,5	141,52	153,24	133,91
Y_{II}	0,25	0,23	0,25	0,22
Y_{NPQ}	0,41	0,45	0,37	0,44
Y_{NO}	0,33	0,32	0,38	0,34

5.5. Estresse oxidativo

A imposição da restrição hídrica promoveu um aumento significativo dos teores de MDA nas folhas de ambos os clones, indicando a ocorrência de estresse oxidativo. Foi detectado um aumento nos teores de MDA de 42 e 32 % nas folhas do clone GG100 e I-144, respectivamente. Nas raízes do clone GG100, o acúmulo de MDA após o tratamento com déficit hídrico foi mais discreto que o observado nas folhas, tendo aumentado em 13 % em relação ao controle (Tabela 7).

Tabela 7. Teores de aldeído malônico (MDA) em folhas e raízes de clones de eucalipto (GG100 e I-44) cultivados em sistema hidropônico por seis dias, com potencial de -0,65 MPa e sem restrição hídrica

	Tratamento	GG100		I-144	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz
MDA (nmol g ⁻¹ MS ⁻¹)	Controle	293,39	110,89	289,11	122,7
	-0,65 MPa	506,87**	128,12**	431,41**	119,5

Médias seguidas por ** diferem dos respectivos controles pelo teste F, em nível de 5% de significância. MS = massa seca.

6. DISCUSSÃO

A restrição hídrica promoveu fechamento estomático e estresse oxidativo, culminado em redução do crescimento

As plantas de ambos os clones submetidas à restrição hídrica apresentaram folhas com sintomas de deficiência hídrica, como: murcha, bordas e ápices necróticos, aspecto retorcido e ressecado e área foliar aparentemente reduzida. Além disso, as folhas adquiriram coloração mais escurecida. A restrição hídrica também ocasionou diminuição da turgidez celular. A manutenção do turgor é um pré-requisito necessário para o alargamento e crescimento celular; portanto, limitações no abastecimento de água podem resultar em grandes reduções no crescimento da planta (Hsiao, 1973).

O potencial hídrico foliar é uma boa referência da condição hídrica da planta, particularmente durante períodos de seca (Levitt, 1980). Neste estudo foi observado que o potencial de -0,65 MPa ocasionou redução do Ψ_w das plantas de eucalipto, indicando que a condição imposta afetou o grau de hidratação dos tecidos vegetais (Figura 1). A medição foi feita na antemanhã, descrevendo assim o estado hídrico da planta sem efeitos das condições ambientais diurnas (alta radiação solar, calor etc), refletindo o equilíbrio de potencial entre a planta e solução (Katerji e Hallaire, 1984). A queda do Ψ_w observada pode estar relacionada com reduções no potencial de pressão (associado à perda de turgidez celular) e, ou do potencial osmótico (aumentos na concentração de solutos osmoticamente ativos no citosol), como resultado da desidratação celular.

Rocha (2013), avaliando os efeitos da seca em eucalipto, demonstrou que um dos mecanismos relacionados à maior tolerância do clone I-144 ao déficit hídrico é sua

capacidade de acumular açúcares solúveis osmorreguladores. Essa capacidade de ajuste osmótico tem sido estudada por vários autores, sendo considerado um critério na escolha de espécies de eucalipto tolerantes à seca (Lemcoff et al., 1994; Merchant et al., 2007).

Sob condições de baixa disponibilidade de água, o fechamento estomático constitui uma das primeiras estratégias utilizadas pelas plantas para diminuir a taxa de transpiração e manter a turgescência celular (Melcher et al., 2009). No presente estudo, a falta de hidratação adequada dos tecidos resultou em diminuição da g_s e de E , como estratégia de redução de perdas excessivas de água pelas plantas. Entretanto, esse mecanismo de proteção ocorre às expensas de reduções na relação C_i/C_a e, conseqüentemente, de A . Essas respostas aconteceram em ambos os clones, sendo o percentual de redução similar entre eles.

A diminuição da concentração interna de CO_2 promove um desequilíbrio entre o ciclo de Calvin e a cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos, isto é, entre a utilização de CO_2 e de energia luminosa, promovendo acúmulo de elétrons nas membranas dos cloroplastos e levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fu e Huang, 2001; Ahmed et al., 2009; Ozkur et al., 2009) capazes de causar danos celulares, como a peroxidação de lipídios de membrana, degradação de ácidos nucléicos e inativação de enzimas e proteínas (Anjum et al., 2011).

O acúmulo de EROs, induzido pelo déficit hídrico, resulta em aumento dos teores de MDA, produto da peroxidação de lipídios, e este pode ser usado como indicador de danos oxidativos. Portanto, menores teores de MDA é um indicador de maior tolerância à seca (Shinozaki et al., 2003; Dhanda et al., 2004). Com a restrição hídrica, o clone GG100 apresentou maiores concentrações de MDA, sendo esse aumento de 42% na parte aérea e 13% nas raízes, indicando maior ocorrência da peroxidação lipídica e menor eficiência da maquinaria antioxidativa em remover EROs, quando comparado ao clone I-144. Esse fato pode ser um indicativo da maior tolerância do I-144 à seca. O acúmulo de MDA nas raízes é resultado do estresse oxidativo que pode ter sido responsável pelo escurecimento das raízes, observado na figura 2.

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas nos valores de fluorescência da clorofila *a*, característica que tem sido utilizada como bom indicador do nível de estresse em plantas (Bolhàr-Nordenkampf e  quist, 1993; Lichtenthaler e Miehe, 1997; Maxwell e Johnson, 2000). O curto espaço de tempo a que as plantas foram submetidas à restri o hídrica pode ter sido a causa da ausência de diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados corroboram os de Silva et al.

(2016), que relataram o efeito do déficit hídrico em dois clones com graus de tolerância à seca contrastantes. Foi observado que a limitação hídrica só promoveu mudanças significativas nos valores de F_v/F_m , F_0 , F_m a partir de 15 dias após a imposição do estresse. Sugere-se, portanto, que a avaliação deste tipo de característica, assim como análises de crescimento e morfológicas, seja conduzida por meio de experimentos mais prolongados.

O aumento de B e Ca promove maior crescimento radicular no clone I-144

Apesar de ser um fator limitante ao crescimento, a queda das folhas é também uma estratégia de plantas submetidas ao déficit hídrico, visando à diminuição das perdas de água por transpiração, que é um mecanismo de ajuste e mitigação a falta de água (Anjum et al., 2011). Esse ajuste promoveu redução de 36% na relação entre massa de matéria seca da parte aérea e das raízes no tratamento com restrição hídrica no clone I-144. A menor relação parte aérea/raiz pode ser benéfica em condições de seca por resultar em maior exploração relativa do perfil de solo, favorecendo a absorção de água e de nutrientes (Marschner, 2012). Resultados semelhantes, que mostram maior crescimento radicular em situação de déficit hídrico, foram encontrados por Durand et al. (2016) em plantas de *Arabidopsis*. De acordo com Caione et al. (2012), a massa de matéria seca das raízes tem sido considerada uma das melhores e importantes variáveis relacionadas à sobrevivência e ao crescimento inicial de mudas de eucalipto no campo. Em geral, quanto mais abundante for o sistema radicular, maior é a sobrevivência. Li (1998) considera a relação parte aérea/raiz uma característica importante a ser considerada em estudos sobre a aclimação à seca em espécies de eucalipto. Maseda e Fernández (2016) verificaram que clones de *Eucalyptus* mais tolerantes à seca apresentaram maior alocação de biomassa para a raiz, considerando esse fato como um bom indicador de tolerância à seca. Portanto, o aumento da biomassa radicular como fator condicionante da tolerância à seca deve estar associado com características que aumentam a captação de água, como o aumento do crescimento radicular e da proporção de raízes finas (Santos et al., 2016). Dessa forma, clones como o GG100, o qual não apresentou alterações na relação parte aérea/raiz, poderão ter sua sobrevivência comprometida em ambientes de deficiência hídrica acentuada.

A maior alocação de alguns nutrientes no sistema radicular, como Ca e B, pode ter sido um dos motivos que acarretou a menor relação parte aérea/raiz no clone I-144, e, conseqüentemente, sua maior tolerância à restrição hídrica. Ambos os nutrientes são

importantes componentes da parede celular. O Ca se destaca como constituinte da lamela média, estrutura que une e estabiliza as células vegetais de modo a formar os tecidos (White e Broadley, 2003). Sua deficiência pode danificar os pontos de crescimento da raiz, podendo interromper o desenvolvimento e até mesmo ocasionar escurecimento e morte do tecido vegetal (Mendes e Gomes, 2013). Já o B é um micronutriente necessário para manter o crescimento e o desenvolvimento normal das plantas (O'Neill et al., 2001), tendo papel importante na estabilidade da parede celular. Esse nutriente possui importante função sobre a formação das ligações borato-diéster nas estruturas dos ramnoglacturonanos II (RG II), as quais são polissacarídeos de pectina responsáveis pela estrutura e resistência mecânica da parede celular. (Kobayashi et al., 1999; Bolaños et al., 2004; O'Neill et al., 2004). Além disso, há evidências de que a deficiência de B esteja relacionada à redução nas funções estomáticas e diminuição da absorção de alguns nutrientes, como K, potencializando os danos ocasionados pelo déficit hídrico (Schon et al., 1990; Hajiboland e Farhanghi, 2011).

A restrição hídrica promoveu redução de 25% na EA e 11% na ET do B no clone I-144. Mattiello et al. (2009) relataram que a absorção do B é severamente reduzida em períodos secos devido a uma redução no fluxo transpiracional da planta, o que está em conformidade com o maior acúmulo observado nas raízes sob restrição hídrica do clone I-144: aumento de 29% no conteúdo e de 18% no teor de B. Segundo Hodecker et al. (2014), a aplicação de B por via foliar pode contribuir para melhorar a absorção de água, devido ao maior incremento do crescimento radicular nas plantas. Esses autores atribuíram a maior tolerância do clone I-144 ao estresse hídrico à sua habilidade de realocar fotoassimilados para o crescimento de raízes, o que foi facilitado pela translocação de B da parte aérea para o sistema radicular. Além disso, o B induziu a expressão de genes relacionados à estabilidade da parede celular. De acordo com Nunes (2010), em situação de estresse hídrico, a presença de B melhorou a condutância estomática e a taxa transpiracional em clones considerados tolerantes à seca.

Já em relação ao nutriente Ca, a restrição hídrica reduziu sua ET em 21%. Essa redução relaciona-se com a baixa mobilidade do Ca na planta, sendo sua eficiência de translocação extremamente dependente da taxa de transpiração (White, 2001). A queda na transpiração, em função da menor condutância estomática, foi evidenciada no presente trabalho. Entretanto a menor translocação desse nutriente para a parte aérea permitiu o aumento no conteúdo de Ca no sistema radicular do clone I-144, aumentando 60% em relação ao controle.

O acúmulo de Ca e a maior produção de raiz pode ser uma estratégia importante de tolerância à seca, devido ao aumento da superfície radicular que proporciona maior absorção de água e nutrientes (Hawkesford et al., 2012). Barros Filho (2014) constatou que a tolerância à seca do clone I-144 pode ser devido à maior absorção e acúmulo de Ca, o qual poderia desencadear vários processos para reduzir os efeitos do estresse hídrico no eucalipto. O Ca apresenta um papel relevante na divisão celular, formação da parede celular, manutenção da integridade das membranas e alongamento das raízes. É também um importante mensageiro secundário de respostas a sinais ambientais e agente regulador de processos metabólicos, quando ligado à calmodulina (Cunha et al., 2010; Marschner, 2012). Além disso, possui efeito regulador sobre as aquaporinas, que formam canais seletivos de água através da membrana celular, facilitando sua entrada e auxiliando na manutenção da turgidez celular (Carvajal et al., 2000).

Segundo Barros Filho (2014), o Ca pode exercer função similar ou até mesmo mais intensa que o B na mitigação dos efeitos do estresse hídrico no clone I-144. O mesmo autor constatou que a tolerância à seca pode ser mitigada pela maior absorção e acúmulo de Ca nas raízes, o qual poderia desencadear vários processos para reduzir os efeitos do estresse hídrico no eucalipto.

7. CONCLUSÕES

- A intensidade das alterações morfológicas e fisiológicas em decorrência da restrição foi maior no clone GG100.
- No tratamento com restrição hídrica, o clone I-144 apresentou menor relação parte aérea raiz, sendo uma possível estratégia de otimização de aquisição de água.
- O tratamento com deficiência hídrica promoveu aumento nos teores de aldeído malônico em ambos os clones avaliados, sendo esse aumento mais significativo no clone GG100, indicando sua maior sensibilidade à restrição hídrica.
- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a maior tolerância à restrição hídrica, normalmente observada em campo para o clone I-144, possa estar ligada ao maior acúmulo de Ca e B nas raízes, o que pode favorecer vários processos antiestresse na planta. Porém são necessários estudos mais aprofundados para confirmar esses efeitos positivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed CB, Rouina BB, Sensoy S, Boukhris M, Abdallah BF. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environ Exp Bot.* 2009;67:345–352.

Anjum S, Xie X, Wang L. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African J Agric Res.* 2011;6:2026–2032.

Barros Filho NF de. Discriminação isotópica do ^{13}C e nutrição com cálcio e boro em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico. [Tese]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2014.

Barros NF, Braga JM, Brandi RM, Defelipo BV. Produção de eucalipto em solos de cerrados em resposta à aplicação de NPK e de B e Zn. *Rev Árv.* 1981;5:90-103.

Battie-Laclau P, Delgado-Rojas JS, Christina M, Nouvellon Y, Bouillet J-P, Piccolo MC, Moreira RM, Gonçalves JLM, Roupsard O, Laclau J-C. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytol.* 2014;203:401–413.

Bilger W, Björkman O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photos.* 1990;25:173–185.

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. Sociedade Brasileira de Genética;* 2007;30:417–422.

Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. Why boron? *Plant Physiol Biochem.* 2004;42:907–912.

Bolhàr-Nordenkampf HR, Öquist G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. *Photosynth Prod a Chang Environ.* Dordrecht: Springer

Netherlands; 1993. p. 193–206.

Carvajal M, Cerdá A, Martínez V. Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *New Phytol.* Cambridge University Press; 2000;145:439–447.

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;40:213–221.

Clark RB. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. *J Plant Nutr.* 1982;5:1039–1057.

Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. Breeding for high water-use efficiency. *J Exp Bot.* Oxford University Press; 2004;55:2447–2460.

Corrêa TR, Picoli EA de T, Souza GA de, Condé SA, Silva NM, Lopes-Mattos KLB, Resende MDV de, Zauza EAV, Oda S. Phenotypic markers in early selection for tolerance to dieback in *Eucalyptus*. *Ind Crops Prod.* Elsevier; 2017;107:130–138.

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;24:1165–1172.

Cunha ACMCM, Paiva HN, Xavier A, Otoni WC. Papel da Nutrição Mineral na Formação de Raízes Adventícias em Plantas Lenhosas. *Pesqui Florest Bras.* 2010;58:35–48.

Dhanda SS, Sethi GS, Behl RK. Indices of Drought Tolerance in Wheat Genotypes at Early Stages of Plant Growth. *J Agron Crop Sci.* Blackwell Verlag GmbH; 2004;190:6–12.

Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. Water deficit enhances C export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiol.* 2016;170:1460-1479.

Ehleringer J. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia*. 1981;102:366–370.

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

Fu J, Huang B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ Exp Bot*. 2001;45:105–114.

Genty B, Briantais J-M, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys*. 1989;990:87–92.

Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*. 2006;65:1330–1337.

Hajiboland R, Farhanghi F. Effect of low boron supply in turnip plants under drought stress. *Biol Plant*. Springer Netherlands; 2011;55:775–778.

Hawkesford M, Horst W, Kichey T, Lambers H, Schjoerring J, Møller IG, White P. Functions of macronutrients. In: Marschner P, editor. *Mineral nutrition of higher plants*. 3th ed. Cambridge: Academic Press; 2012. p.135-89.

Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*. 1968;125:189–198.

Hendrickson L, Furbank RT, Chow WS. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. 2004;73–81.

Hodecker BER, Barros NF, Da Silva IR, Diola V, Sarkis JES, Loureiro ME. Boron delays dehydration and stimulates root growth in *Eucalyptus urophylla* (Blake, S.T.) under osmotic stress. *Plant Soil*. 2014;384:185–199.

Hodecker, BER. Comparison of drought stress responses of tolerant and sensitive eucalypt genotypes. [Tese]. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa; 2015.

Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Plant*. 1999;1:604–611.

Hsiao TC. Plant Responses to Water Stress. *Annu Rev Plant Physiol*. 1973;24:519–570.

Indústria Brasileira de Árvores. Relatório- Ibá 2017: ano base 2016. Disponível em: http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf Acesso em: 25 jan 2018

Karnovsky M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high electron microscopy. *J Cell Biol*. 1965;27:137–138.

Katerji N, Hallaire M. Les grandeurs de référence utilisables dans l'étude de l'alimentation en eau des cultures. *Agron Sci* 1984;4:999-1008

Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T. Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiol. American Society of Plant Biologists*; 1999;119:199–204.

Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of Q A redox state and excitation energy fluxes. 2004;209–218.

Laisk A, Loreto, F. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol*. 110:903-912. 1996.

Lemcoff JH, Guarnaschelli AB, Garau AM, Bascialli ME, Ghera CM. Osmotic adjustment and its use as a selection criterion in Eucalyptus seedlings. *Can J For Res. NRC Research Press Ottawa, Canada*; 1994;24:2404–2408.

Levitt, J. Response of plants to environmental stress. II: Water radiation, salt and other stress. New York: Academic Press, 1980. 606 p.

Li B, McKeand SE, Allen HL. Genetic Variation in Nitrogen Use Efficiency of Loblolly Pine Seedlings. *Forest Sci*; 1991;37:613-626

Li C. Some aspects of leaf water relations in four provenances of *Eucalyptus microtheca* seedlings. *For Ecol Manage*. 1998;111:303–308.

Lichtenthaler HK, Miehe JA. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci*. Elsevier Current Trends; 1997;2:316–320.

Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. Academic. London; 1995.

Marschner, P. Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2012.

Maseda PH, Fernández RJ. Growth potential limits drought morphological plasticity in seedlings from six *Eucalyptus* provenances. *Tree Physiol*. 2015;36:243–251.

Mattiello EM, Ruiz HA, Silva IR da, Barros NF de, Neves JCL, Behling M. Transporte de boro no solo e sua absorção por eucalipto. *Rev Bras Cien do Solo*. 2009;33:1281–1290.

Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence — a practical guide. *J Exp Bot*. 2000;51:659–668.

Melcher K, Ng L-M, Zhou XE, Soon F-F, Xu Y, Suino-Powell KM, Park S-Y, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J, Peterson FC, Jensen DR, Yong E-L, Volkman BF, Cutler SR, Zhu J-K, Xu HE. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*. 2009;462:602–608.

Merchant A, Callister A, Arndt S, Tausz M, Adams M. Contrasting Physiological Responses of Six *Eucalyptus* Species to Water Deficit. *Ann Bot*. Oxford University Press; 2007;100:1507–1515.

Müller C, Hodecker BER, Merchant A. Nutritional Efficiency of *Eucalyptus* Clones Under Water Stress. *Revis Bras Cien Solo*. 2017; 41:e0160528.

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;64:116–131.

Navarrete-Campos D, Bravo LA, Rubilar RA, Emhart V, Sanhueza R. Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. *New For. Springer Netherlands*; 2013;44:119–134.

Nunes FN. Crescimento e expressão gênica em clones de eucalipto influenciados pelo boro e déficit hídrico. [Tese]. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa; 2010

O'Brien, TP, Mccully ME. The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne: Termarcarphi Pty. Ltd, 1981, 45p.

O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 2001;294:846–849.

O'Neill MA, Ishii T, Albersheim P, Darvill AG. RhamnogalacturonanII: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol. Annual Reviews*; 2004;55:109–139.

Oxborough K, Baker N. An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization. *Plant, Cell Environm*. 1997;20:1473–1483.

Ozcur O, Ozdemir F, Bor M, Turkan I. Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. *Environ Exp Bot*. 2009;66:487–492.

Pita-Barbosa A, Hodecker BER, Barros NF de. Boron as mitigator of drought damage in *Eucalyptus* : a genotype-dependent mechanism ? *Sci For*. 2016; 851–861.

Ramos S, Valdemar F, Ferreira R, Araújo J, Carvalho J. Crescimento e teores de boro em plantas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) cultivadas em dois latossolos sob influência de doses de boro e disponibilidade de água. *Rev Árvore*. 2009; 33.

Rezende JB, Pereira JR, Botelho D de O. Expansão da cultura do eucalipto nos municípios mineiros e gestão territorial. *Cerne*. 2013;19:1–7.

Rocha JBO de. Resiliência de clones de eucalipto ao déficit hídrico e nutricional.[Tese] Viçosa: Universidade federal de Viçosa; 2013.

Ryan M, Stape J, Binkley D, Fonseca S, Loos R. Factors controlling *Eucalyptus* productivity: How water availability and stand structure alter production and carbon allocation. *For Ecol Manage*. Elsevier. 2010; 259:1695–1703.

Sakya AT, Dell B, Huang L. Boron requirements for *Eucalyptus globulus* seedlings. *Plant Soil*. Springer. 2002; 246:87–95.

Sant'Anna-Santos BF, Azevedo AA, Silva LC, Oliva MA. Diagnostic and prognostic characteristics of phytotoxicity caused by fluoride on *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *An Acad Bras Cienc*. 2012;84:689–702.

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.

Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*. 1965;148:339–346.

Schon MK, Novacky A, Blevins DG. Boron induces hyperpolarization of sunflower

root cell membranes and increases membrane permeability to K⁺. Plant Physiol. American Society of Plant Biologists; 1990;93:566–71.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opin Plant Biol. 2003;6:410–7.

Shvaleyeva L, Costa e Silva F, Breia E, Jouve J, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues ML, Pereira JS, Chaves MM. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. Tree Physiol. 2006;26:239–248.

Siddiqi MY, Glass ADM. Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. J Plant Nutr. 1981;4:289–302.

Silva TR da, Cazetta JO, Carlin SD, Telles BR, Silva TR da, Cazetta JO, Carlin SD, Telles BR. Drought-induced alterations in the uptake of nitrogen, phosphorus and potassium, and the relation with drought tolerance in sugar cane. Ciência e Agrotecnologia. 2017;41:117–127

Silva I, Souza M, Rodrigues A, Correia L, Veloso R, Santos J, Titon M, Gonçalves J, Laia M. Determination of parameters for selection of *Eucalyptus* clones tolerant to drought. African J Agric Res. 2016;11:3940–3949.

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. Elsevier. 2010;259:1684–1694.

Swiader JM, Chyan Y, Freiji FG. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. J Plant Nutr. 1994;17:1687–1699.

Tardieu François, Thierry S. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. J Exp Bot. 1998;49:419–432.

Trevizam R, Brondani GE, Nery FU, Gonçalves AN, Almeida M de. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. *Cerne*. 2011;17:215–222.

Tatagiba SD, Pezzopane JE., Reis EF dos, Penchel RM. Performance of six clones of eucalyptus in response to substrate water availability. *Eng na Agric*. 2009;17:179–189.

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*. 2013;79:263–276.

Warren CR, Aranda I, Cano FJ. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. *Plant Cell Environ*. 2011;34:1609–1629.

Wellburn AR. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J Plant Physiol*. 1994;144:307–313.

White PJ. The pathways of calcium movement to the xylem. *J Exp Bot*. Oxford University Press; 2001;52:891–899.

White PJ, Broadley MR. Calcium in plants. *Ann Bot*. Oxford University Press; 2003;92:487–511.