

FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA

**PLASTICIDADE EM *Eucalyptus* sp. À DISPONIBILIDADE HÍDRICA:  
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM CLONES  
CONTRASTANTES À SECA DE PONTEIROS DO VALE DO RIO DOCE  
SUBMETIDOS A CICLOS DE ENCHARCAMENTO E SECAGEM**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS- BRASIL  
2017

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

T

O48p  
2017

Oliveira, Franciele Santos, 1992-

Plasticidade em *Eucalyptus* sp. à disponibilidade hídrica :  
respostas fisiológicas e metabólicas em clones contrastantes à  
Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce submetidos a ciclos de  
encharcamento e secagem / Franciele Santos Oliveira. – Viçosa,  
MG, 2017.

viii, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Plantas - Metabolismo. 3. Eucalipto -  
Fisiologia vegetal. 4. Secagem. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de  
Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

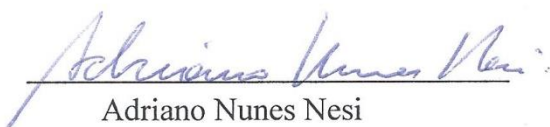
CDD 22 ed. 583.766

FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA

**PLASTICIDADE EM *Eucalyptus* sp. À DISPONIBILIDADE HÍDRICA:  
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS EM CLONES  
CONTRASTANTES À SECA DE PONTEIROS DO VALE DO RIO DOCE  
SUBMETIDOS À CICLOS DE ENCHARCAMENTO E SECAGEM**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.

  
Adriano Nunes Nesi

  
Ivo Ribeiro da Silva

  
Wagner Luiz Araújo  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, e por ser meu sustento e refúgio a cada dia. Agradeço também pelas pessoas que Ele colocou no meu caminho que foram grandes presentes.

A Maria, pela presença doce e intercessora.

Aos meus pais, Amélia e Carlos (*in memorium*), que nunca mediram esforços para minha formação. Agradeço pelo imenso amor, dedicação e ensinamentos.

As minhas irmãs, pelo amor e amizade.

Ao meu orientador, Wagner L. Araújo, pelos ensinamentos, orientação, oportunidades e confiança.

Aos professores Adriano Nunes-Nesi e Ivo Ribeiro da Silva, pela colaboração e orientação ao longo desse trabalho.

A Cenibra e em particular ao Dr. Fernando Palha Leite pela concessão das mudas.

A todos da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) que me ajudaram ao longo desse período e por dividir bons momentos.

Aos meus amigos, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e à Universidade Federal de Viçosa pela formação e por disponibilizar sua estrutura para a realização dos experimentos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO I .....	6
PLASTICIDADE EM CLONES DE <i>Eucalyptus</i> sp. SUBMETIDOS A CICLOS DE ENCHARCAMENTO E SECAGEM .....	6
1- INTRODUÇÃO .....	6
2- MATERIAL E MÉTODOS .....	8
2.1- Material vegetal e condições de cultivo .....	8
2.2- Imposição do estresse .....	9
2.3- Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	10
2.4- Coletas para análises bioquímicas .....	10
2.5- Análises de pigmentos fotossintéticos e bioquímicas .....	11
2.6- Determinação da biomassa seca .....	12
2.7- Determinação da área foliar específica .....	13
2.8- Determinação do Teor Relativo de Água (TRA) .....	13
2.9- Taxa de crescimento relativo em altura .....	13
2.10- Delineamento experimental .....	13
3- RESULTADOS .....	14
3.1- Área foliar específica (AFE), alocação de biomassa e taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) .....	14
3.2- Teor relativo de água (TRA) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) .....	16
3.3- Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	16
3.4- Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais .....	19
4- DISCUSSÃO .....	22
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
CAPÍTULO II .....	33
PLASTICIDADE EM CLONES DE <i>Eucalyptus</i> sp. SUBMETIDOS A SUCESSIVOS CICLOS DE ENCHARCAMENTO E SECAGEM: É POSSÍVEL PLANTAS MEMORIZAR O ESTRESSE? .....	33
1- INTRODUÇÃO .....	33
2- MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1- Material vegetal e condições de cultivo .....	35
2.2- Imposição do estresse .....	36

2.3-	Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	37
2.4-	Coletas para análises bioquímicas .....	38
2.5-	Análises de pigmentos fotossintéticos e bioquímicas.....	38
2.6-	Determinação da biomassa seca .....	40
2.7-	Determinação da área foliar específica.....	40
2.8-	Determinação do Teor Relativo de Água (TRA).....	40
2.9-	Taxa de crescimento relativo em altura .....	41
2.10-	Delineamento experimental .....	41
3-	RESULTADOS .....	41
3.1-	Area foliar específica (AFE), alocação de biomassa e taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) .....	41
3.2-	Teor relativo de água (TRA) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) .....	44
3.3-	Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	45
3.4-	Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais .....	49
4-	DISCUSSÃO .....	52
5-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
6-	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	61
7-	CONCLUSÃO GERAL.....	62

## RESUMO

OLIVEIRA, Franciele Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Plasticidade em *Eucalyptus* sp. à disponibilidade hídrica: Respostas fisiológicas e metabólicas em clones contrastantes à Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce submetidos a ciclos de encharcamento e secagem.** Orientador: Wagner Luiz Araújo.

A demanda por madeira vem, nos últimos anos, sofrendo largos incrementos em grande parte devido à sua imensa utilização em diversos setores da indústria. Cumpre ressaltar que o tipo de solo, condições climáticas, dentre outros fatores podem largamente afetar o desenvolvimento das plantas, em particular em *Eucalyptus* sp. Cabe mencionar, no entanto, que novas áreas de cultivo podem apresentar características contrastantes como, por exemplo, solos que permanecem encharcados por um determinado período e também áreas que sofrem com limitações na disponibilidade hídrica. No Brasil, uma anomalia relatada em regiões que passam por situações de encharcamento, conhecida como Seca de Ponteiros do Eucalipto Vale do Rio Doce (SPEVRD), tem ocasionado vários distúrbios fisiológicos em clones de eucalipto. Embora alguns estudos tenham sido realizados no intuito de se compreender essa anomalia, pouco se sabe acerca dos mecanismos adotados por esses materiais frente a ciclos consecutivos de estresse e como a deficiência hídrica modula essas respostas. Nesse sentido, a presente proposta buscou compreender os mecanismos fisiológicos e metabólicos associados a essas respostas diferenciais, ao avaliar a plasticidade frente às flutuações na disponibilidade hídrica em clones de *Eucalyptus* sp. submetidos a ciclos de encharcamento e secagem. Para tanto, esse trabalho foi dividido em duas partes independentes, mas complementares. Na primeira parte avaliaram-se os impactos metabólicos em clones de *Eucalyptus* sp. com tolerância diferencial a SPEVRD frente a um ciclo de encharcamento seguido por um ciclo de déficit hídrico. Na segunda parte desse trabalho o mesmo material foi submetido a dois ciclos de estresse (encharcamento e deficiência hídrica) seguidos por períodos de completa recuperação entre os estresses. Para isso, em ambos os experimentos utilizou-se clones contrastantes com tolerância diferencial à SPEVRD sendo um tolerante e outro sensível em um esquema fatorial 2x2 (dois clones e dois regimes hídricos) com seis repetições. Ao longo de todos os experimentos foram mensurados os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* sendo a fotossíntese a variável utilizada como indicador da recuperação. Com isso, após os estresses, em ambas as partes, procurou-se promover a recuperação completa desses

materiais baseada na recuperação das taxas fotossintéticas a níveis similares aos das plantas controle (ausência de estresse). Ademais, em momentos específicos (antes da imposição do estresse, após o encharcamento, recuperação, déficit hídrico e recuperação) foram coletadas amostras para análises bioquímicas. No primeiro experimento, ciclo curto, os resultados obtidos indicam que, embora o clone tolerante a SPEVRD apresente reduções precoces nos parâmetros de trocas gasosas e também no  $\Psi_w$  comparadas ao clone sensível, a presença de mecanismos de quiescência parece ser de suma importância para a tolerância diferencial observada a nível de campo. Além disso, a alocação diferencial de biomassa, destacando-se aumentos expressivos na biomassa radicular, parece auxiliar a uma maior “tolerância” desse clone aos dois eventos distintos e sucessivos de estresse. De modo interessante, no segundo experimento, os resultados indicam que os clones sujeitos a ciclos recorrentes de estresses apresentam respostas distintas daquelas observadas após uma única situação de estresse e ainda é possível inferir que a imposição de ciclos consecutivos de estresse promova respostas que permitam, de certo modo, favorecer um melhor desempenho do clone tolerante. Em adição, é plausível sugerir que a aclimação diferencial de clones de eucalipto a eventos múltiplos de estresse hídrico (por falta e excesso) parece ser dependente de um reajuste fino de processos metabólicos incluindo fotossíntese, respiração e metabolismo de açúcares e aminoácidos indicando a ocorrência de uma possível “memória ao estresse”.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Franciele Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Plasticity in *Eucalyptus* sp. to water availability: Physiological and metabolic responses in two clones with differential tolerance to shoot blight following waterlogging and drought cycles.** Adviser: Wagner Luiz Araújo.

The wood demand has considerably been increasing during the last years due to its utilization in different industry sectors. Remarkably, the type of soil, climatic conditions among other factors may affect plant development, particularly in *Eucalyptus* sp.. It is worth to mention, however, that new crop areas may present contrasting characteristics such as soils that remain flooded for undetermined periods and also areas that have limitations in water availability. In Brazil, there are reports on one physiological anomaly occurring in regions subjected to periodic waterlogging, known as shoot die-back of eucalyptus in the Vale do Rio Doce (SPEVRD). Nevertheless, there are materials presenting contrasting tolerance to this anomaly. To date, relatively few studies have been performed aiming at understanding this anomaly. As such and the mechanisms adopted for these contrasting materials facing multiple cycles of stresses and how exactly water limitation modulate such responses remains unclear. This proposal aimed at understanding the physiological and metabolic mechanisms associated to the differential plasticity against fluctuations in water availability in clones of *Eucalyptus* sp. submitted to cycles of waterlogging and drought. To this end, this work was divided into two independent but complementary parts. In the first part, the metabolic changes in eucalyptus clones with differential tolerance to SPEVRD was analyzed following one cycle of waterlogging followed by a cycle of water deficit. In the second part the same plant material was submitted to two cycles of stresses (waterlogging and water deficit) followed by periods of complete recovery between stresses. During all experiments gas exchange and fluorescence of chlorophyll *a* fluorescence were monitored and photosynthesis was used as indicator of stress recovery. Thereby, after all stresses it was tried to promote the full recovery of those materials based on the recovery of photosynthetic rates at similar levels to those of non-stressed plants. Furthermore, in specific moments (before stress, after waterlogging, recovery, water deficit and recovery) samples were collected to biochemical analyzes. Following a short cycle of stress, our results demonstrated that although the tolerant clone to SPEVRD presented early reductions in both gas exchange parameters and  $\Psi_w$  compared to the sensitive clone, the presence of quiescent mechanisms seems to be of

pivotal importance to the differential tolerance observed under field conditions. Moreover, the differential biomass allocation characterized by significant increases in root biomass seems to contribute to higher tolerance of this clone to different and successive cycles of stress. Interestingly, in the second experiment clones subjected to multiple cycles of stresses display differential responses compared to the ones observed after one cycle of stress. Also, it seems possible to infer that the imposition of multiple cycles of stresses promote responses that allow, at least partially, a better performance of the tolerant clone. Altogether, the differential acclimation of eucalyptus clones to multiple cycles of water stress either by excess or limitation seems to be dependent on a fine tuning of metabolic processes such as photosynthesis, respiration and metabolism of sugars and amino acids indicating a possible occurrence of “stress memory”.

## INTRODUÇÃO GERAL

A demanda por madeira vem, nos últimos anos, sofrendo largos incrementos em grande parte devido a sua imensa utilização em diversos setores da indústria. Cumpre mencionar que, em 2014, a área ocupada por árvores plantadas para fins comerciais abrangeu 7,74 milhões de hectares. Desse total, 34 % foram destinados ao segmento de celulose e papel, 26,8 % a produtores independentes e fomentados, 15,2 % a siderurgia a carvão vegetal, 10,2 % a investidores financeiros, 6,8 % a painéis de madeira e pisos laminados, 3,6 % a serrados, móveis e outros produtos sólidos e o restante (3,4 %) a outras finalidades (Ibá e Pöyry, 2014 in Indústria Brasileira de Árvores 2015).

Nesse cenário, destaca-se o gênero *Eucalyptus* que, particularmente no Brasil, apresenta bom desenvolvimento devido às condições edafoclimáticas, alcançando crescimento mais rápido em relação aos outros países bem como alta produtividade (IMA Florestal, 2015). Considerando-se a dimensão desses plantios, a seleção de materiais genéticos é de fundamental interesse em sítios florestais com marcante variação de água no solo (Chaves et al., 2004). Tendo em vista que novas áreas vêm sendo utilizadas para os plantios florestais, diferentes tipos de solos foram abrangidos com esses novos plantios. O excesso de água no solo, em uma escala temporal maior, pode levar a morte e também ao comprometimento do sistema radicular de árvores sujeitas a essas condições devido à deficiência em oxigênio (Basak et al., 2015) também conhecida como hipoxia. Registre-se que o eucalipto apresenta determinada sensibilidade à deficiência de oxigênio nos solos (Lacerda, 2013). Adicionalmente, a limitação hídrica promove reduções no rendimento vegetal sendo um dos maiores entraves à expansão das áreas de cultivo (Chaves & Oliveira, 2004).

Na região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, foi observada a ocorrência de uma anomalia então denominada de Seca de Ponteiros de Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) (Ferreira, 1989). Os sintomas associados a essa anomalia também foram detectados em outras regiões do Vale do Rio Doce bem como em outros estados brasileiros incluindo Pará, Bahia, Maranhão, São Paulo e Paraná (Leite et al., 2014). Cabe mencionar que essa região onde esse distúrbio foi primeiramente observado se caracteriza por apresentar áreas onde a altitude varia entre 200 a 350 m e que apresenta temperaturas médias maiores que 23 °C. Os efeitos desse distúrbio foram observados em solos localizados nos fundos de vales (Cambissolos e Neossolos Flúvicos) onde há, normalmente, problemas temporários de drenagem (Leite et al., 2014). Embora pouco

se saiba sobre as causas associadas a essa anomalia, os sintomas usualmente observados são relativamente bem caracterizados incluindo: perda da dominância apical, lesões nos ramos e nas folhas, murcha aparente e queda foliar, encarquilhamento e trincamento da casca e, em última instância, a seca de ponteiros (Ferreira & Milani, 2002; Alfenas, 2004).

Tais danos podem ser visualmente observados a partir de fevereiro estendendo até setembro onde ainda é possível notar alguns sintomas e cumpre ressaltar que nesse período as plantas já começam a recuperar o crescimento (Leite et al., 2014). A sintomologia da SPEVRD é usualmente notada após o encharcamento temporário do solo, fenômeno esse que pode acarretar em prejuízos para os processos de trocas gasosas podendo afetar, de forma negativa, a absorção e translocação de nutrientes e comprometendo o metabolismo da planta como um todo (Almeida et al., 2013). Coletivamente, essas informações reforçam a importância de melhor se compreender essa anomalia de modo a garantir a sustentabilidade da produção de eucalipto nas mais diversas áreas de cultivo. Em condições de campo, a SPEVRD é normalmente observada após um período de alta precipitação seguida por período de seca. Nesse contexto, Almeida et al., (2013) verificaram que no ano onde ocorreu a segunda maior incidência de SPEVRD além da maior precipitação durante o período chuvoso esse foi também o ano hidrológico com a menor precipitação durante o período seco.

Tomados em conjunto, os dados descritos acima indicam que se faz necessário, entender como clones de eucalipto lidam com esses extremos climáticos, uma vez que observações de campo permitiram a identificação de materiais que se sobressaem após esses eventos, apresentando determinada tolerância, ao passo que existem materiais que são mais susceptíveis (Ferreira, 1986).

Em resposta às condições de alagamento as plantas podem desenvolver duas estratégias, a saber: (i) *Low Oxygen Quiescence Syndrome* (LOQS), caracterizada pela conservação de energia e carboidratos, e (ii) *Low Oxygen Escape Syndrome* (LOES), que envolve alterações morfo-anatômicas que garantem uma melhora nas trocas gasosas dos órgãos alagados (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Em um trabalho recente, (Harguindeguy, 2013), utilizando dois clones de eucalipto com tolerância diferencial à SPEVRD, notou que o clone tolerante apresenta mecanismos que o caracterizam como quiescente, uma vez que esse material teve o crescimento da parte aérea paralisado, desviando, assim, a energia para outros processos, ao passo que o clone sensível ativou respostas características de escape como a formação de raízes superficiais. Assim, a tolerância diferencial desses materiais parece estar associada, ao menos em parte, a

mecanismos distintos de resposta à deficiência de oxigênio. A formação dessas estruturas associadas à estratégia de escape pode comprometer o desempenho de plantas quando submetidas a uma posterior condição de déficit hídrico, uma vez que tais raízes são mais superficiais e tornam as plantas mais susceptíveis ao déficit hídrico (Kozlowski, 1997). Vale salientar que pouco se sabe acerca dos efeitos do excesso hídrico e seca em espécies lenhosas e que, possivelmente, a ocorrência da SPEVRD esteja associada a esses dois eventos.

Com efeito, alguns estudos tem buscado compreender os impactos do estresse hídrico (excesso e falta) combinado a outros estresses. Por exemplo, os efeitos de inundações, a longo prazo, com água e salinidade foram investigados em *Populus euphratica* verificando-se que o alagamento promove diminuições na fotossíntese ( $A$ ), na condutância estomática ( $g_s$ ) bem como na transpiração ( $E$ ) em relação às plantas controle (Azizi et al., 2017). Em adição, modelos de respostas fisiológicas compreendendo as fases de inibição e aclimatação às condições de alagamento indicam que a primeira situação (fase inibitória) leva à hipoxia culminando em um desequilíbrio hormonal que resulta em última instância, no fechamento estomático (Herrera, 2013). Dentre essas alterações hormonais cabe ressaltar o aumento na síntese de etileno (Kozlowski, 1997), bem como do ácido abscísico (ABA), resultando no fechamento estomático (Else et al., 1996). Adicionalmente, foi observado que em *Campsiandra laurifolia* (Mimosaceae) e *Pouteria orinocoensis* (Sapotaceae) o conteúdo de ABA nas folhas e na seiva do xilema obteve incrementos durante a transição entre a drenagem e a completa inundação do solo em paralelo com quedas em  $g_s$  (Herrera, 2013). Vale ressaltar que o metabolismo do carbono também é alterado nessas condições. Em *Distylium chinense* após 60 dias de alagamento houve incrementos nos teores de amido e açúcares solúveis nas folhas (Liu, et al., 2014). Em conjunto, as informações acima demonstram uma grande flexibilidade dos vegetais, de modo geral, em resposta às condições de alagamento no que respeita mudanças na morfologia e no metabolismo.

Outro estresse reconhecidamente importante que acomete às plantas é o déficit hídrico. Com o decorrer do estresse há uma diminuição em  $g_s$  que pode comprometer a  $A$  e  $E$ ; no entanto, esses efeitos podem promover um incremento na eficiência do uso da água, uma vez que a redução em  $g_s$  limita mais fortemente  $E$  em relação a  $A$  (Xu et al., 2010). Com a diminuição na disponibilidade de água as plantas tendem a diminuir a transpiração de forma rápida, fechando os estômatos e, a longo prazo, diminuindo também o crescimento foliar, reduzindo assim a área foliar e, conseqüentemente, a transpiração (Tardieu, 2005). Com o fechamento estomático decréscimos simultâneos

em A são observados, devido à sensibilidade ao déficit hídrico (Luna et al., 2005). Cabe ressaltar também que em função da intensidade e duração da seca, parâmetros como A e o crescimento podem ser recuperados quando as plantas são submetidas à re-irrigação (Xu et al., 2010).

Tomados em conjunto, os resultados apresentados acima indicam que ambos os estresses (excesso e falta de água) promovem alterações fisiológicas e metabólicas em plantas. Registre-se também que pouco ou nada se sabe a respeito da combinação desses dois estresses em plantas lenhosas e, particularmente, como seus efeitos estariam relacionados à tolerância diferencial à SPEVRD observada em clones de eucalipto. Ao considerar-se que secas e inundações tiveram largos incrementos nos últimos 50 anos nas áreas agricultáveis em várias regiões do mundo (Bailey-Serres et al., 2012) e dada a importância do eucalipto na economia nacional, faz-se necessário, portanto, verificar quais os mecanismos desenvolvidos por esses clones que apresentam tolerância diferencial a SPEVRD para lidarem com tais eventos extremos.

Como já mencionado, dentre os fatores que podem estar associados a essa anomalia, destaca-se o aumento nos teores de alguns nutrientes nas plantas, como ferro (Fe) e Manganês (Mn) durante períodos de hipoxia e seca, consecutivamente (Ferreira, 1986). Nesse sentido, trabalhos anteriores buscaram compreender os efeitos da hipoxia e também do acúmulo de Mn por esses materiais, uma vez que essa relação já tinha sido evidenciada no campo. Assim, Harguindeguy (2013) notou que além de respostas de quiescência (clone tolerante) e escape (clone sensível), o Mn não foi o principal causador de danos nas plantas. Ademais, Lacerda (2013) verificou que reduções na concentração de oxigênio promovem redução no crescimento em ambos os clones, sendo esse efeito mais pronunciado no clone sensível. Além disso, o declínio na concentração de O<sub>2</sub> afeta, de forma mais significativa, a g<sub>s</sub> do clone tolerante comparado ao sensível evidenciando-se, mais uma vez, que o excesso de Mn atua, a longo prazo, para a observação dessa anomalia. Cumpre ressaltar, todavia, que a toxidez por Mn foi observada no clone sensível. Não obstante, Leite et al., (2014) verificaram que os clones sensíveis em condições de campo no Vale do Rio Doce acumularam mais Mn em relação aos tolerantes.

De posse dos resultados acima e das observações de campo, nota-se que a compreensão do efeito da hipoxia e do acúmulo de Mn possibilitaram a identificação de respostas diferenciais entre clones ditos tolerante e sensível. Embora estudos já tenham sido realizados avaliando esses dois fatores, pouco ou nada se sabe acerca da interação com o estresse hídrico modulando essas respostas. Como já mencionado, após o excesso

de chuvas, que resulta em uma deficiência de O<sub>2</sub> no solo, períodos de seca são normalmente observados *a posteriori*. Compreender a plasticidade desses materiais frente a esses dois estresses em conjunto permitirá, assim, identificar pontos importantes para seleção de materiais mais tolerantes.

Nesse sentido, a presente proposta busca compreender, em detalhes, os mecanismos fisiológicos e metabólicos associados a essas respostas diferenciais, ao avaliar a plasticidade frente às flutuações na disponibilidade hídrica em clones de *Eucalyptus* sp. submetidos a ciclos de encharcamento e secagem. Para tanto, esse trabalho foi dividido em duas partes independentes, mas complementares. Na primeira parte avaliaram-se os impactos metabólicos em clones de *Eucalyptus* sp. contrastantes com tolerância diferencial a SPEVRD frente a um ciclo de encharcamento seguido por um ciclo de déficit hídrico. Na segunda parte desse trabalho o mesmo material foi submetido a dois ciclos de estresse (encharcamento e deficiência hídrica). Após os estresses, em ambas as partes, procurou-se promover a recuperação completa desses materiais baseada na recuperação das taxas fotossintéticas a níveis similares aos das plantas controle (ausência de estresse). Os resultados obtidos aqui indicam que plantas submetidas a apenas um ciclo de estresse apresentam respostas bastante similares no que se refere à fisiologia e metabolismo, contudo o clone tolerante sujeito aos estresses apresenta uma resposta mais precoce em relação ao clone sensível. No entanto, ciclos consecutivos de estresse são capazes de promover uma certa “memória ao estresse” através de ajustes fisiológicos e metabólicos que melhoram a performance desse material frente a tais condições.

## CAPÍTULO I

### PLASTICIDADE EM CLONES DE *Eucalyptus* sp. SUBMETIDOS A CICLOS DE ENCHARCAMENTO E SECAGEM

#### 1- INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é amplamente difundido no Brasil e isso se deve, em grande parte, ao fato de que nosso território apresenta condições edafoclimáticas favoráveis para seu bom desenvolvimento, culminando em alta produtividade (IMA Florestal, 2015). Dentre essas diversas áreas no território brasileiro destaca-se, em particular, a região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais. De modo particular, essa região onde observou, em meados dos anos 70, uma anomalia que compromete o bom desempenho de espécies de eucalipto, anomalia essa denominada de Seca de Ponteiros de Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) (Ferreira, 1989). Registre-se que a região onde esse distúrbio foi primeiramente observado se caracteriza por apresentar uma altitude que varia entre 200 a 350 m e com temperaturas médias maiores que 23 °C. Além disso, os efeitos desse distúrbio são usualmente observados em solos localizados nos fundos de vales (Cambissolos e Neossolos Flúvicos) onde há, normalmente, problemas temporários de drenagem (Leite et al., 2014). Embora pouco se saiba sobre as causas associadas a essa anomalia, os sintomas usualmente observados são relativamente bem caracterizados incluindo: perda da dominância apical, lesões nos ramos e nas folhas, murcha aparente e queda foliar, encarquilhamento e trincamento da casca e, em última instância, a seca de ponteiros (Ferreira & Milani, 2002; Alfenas, 2004). Os danos podem ser visualmente observados a partir de fevereiro estendendo até setembro quando ainda é possível notar alguns sintomas. Cabe ressaltar também que ao final desse período as plantas já começam a recuperar o crescimento (Leite et al., 2014).

Os sintomas da SPEVRD são normalmente observados após o encharcamento do solo, fenômeno esse que pode acarretar em prejuízos para os processos de trocas gasosas podendo afetar, de forma negativa, a absorção e redistribuição de nutrientes e comprometendo o metabolismo da planta como um todo (Almeida et al., 2013). Aumentos nos teores de ferro (Fe) e manganês (Mn) observados nas plantas durante a hipoxia e exposição à seca e submetidas à seca posteriormente sugerem ser esse um dos efeitos que levam a essa anomalia (Ferreira, 1986). O excesso de água no solo promove alterações em parâmetros de trocas gasosas, como por exemplo, reduções na

assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*) após sete dias de inundação em *Quercus rubra* (Sloan et al., 2016). Não obstante, alterações hormonais também podem ser evidenciadas culminando, em última instância, no fechamento estomático (Herrera, 2013) destacando-se aumento na síntese de etileno (Kozlowski, 1997) e ácido abscísico (ABA) (Else et al., 1996). Vale ressaltar que o metabolismo do carbono também é alterado nessas condições. Assim, em *Distylium chinense* após 60 dias de excesso hídrico incrementos nos teores de amido e açúcares solúveis nas folhas foram observados (Liu, et al., 2014). Assim como o alagamento, outro estresse que compromete o desenvolvimento de plantas é a deficiência hídrica. Além disso, esse estresse é seguido por períodos de excesso hídrico no solo podendo explicar, então, ao menos parcialmente, o aparecimento da SPEVRD. Cumpre mencionar também que o déficit hídrico pode comprometer *g<sub>s</sub>* afetando, assim, *A* e *E* ao longo da deficiência hídrica (Xu et al., 2010) e, a longo prazo, diminuir o crescimento foliar (Tardieu, 2005).

Coletivamente, os resultados apresentados acima indicam que tanto o excesso quanto a falta de água promovem alterações fisiológicas e metabólicas significativas em plantas. É importante mencionar também que observações recentes indicam que tais estresses parecem atuar de modo a potencializar a ocorrência de sintomas associados à SPEVRD. Nesse sentido, trabalhos anteriores buscaram compreender, de modo isolado e/ou combinado, os efeitos da hipoxia e também do acúmulo de Mn por esses materiais, uma vez que essa relação já tinha sido evidenciada em condições de campo. Harguindeguy (2013) notou que além de respostas de quiescência (clone tolerante) e escape (clone sensível), o Mn não foi o principal causador de danos nas plantas. Lacerda (2013) verificou que reduções na concentração de oxigênio promovem diminuição no crescimento em ambos os clones, sendo o efeito mais pronunciado no clone sensível particularmente de raízes. Além disso, esse declínio na concentração de O<sub>2</sub> afeta, de forma mais significativa, a *g<sub>s</sub>* do clone tolerante quando comparado ao clone sensível. Esse mesmo autor demonstrou que o excesso de Mn atua, a longo prazo, para a observação dessa anomalia, embora tenha sido evidenciada a toxidez no clone sensível. Em adição, Leite et al., (2014) verificaram também que clones sensíveis em condições de campo no Vale do Rio Doce acumularam mais Mn que os tolerantes.

Embora estudos já tenham sido feitos avaliando-se em *Eucalyptus* esses dois fatores (hipoxia e excesso de Mn), pouco ou nada se sabe acerca da interação do déficit hídrico modulando essas respostas que culminam no aparecimento dos sintomas da SPEVRD. Como já mencionado, após o excesso de chuvas que resulta em uma deficiência de O<sub>2</sub> no solo, períodos de seca subsequentes são comumente observados. Compreender a

plasticidade de materiais com tolerância diferencial frente a esses estresses (encharcamento e déficit hídrico), em conjunto, nos permitirá identificar pontos importantes para seleção de materiais mais tolerantes dada a importância do eucalipto na economia nacional. Assim, o presente trabalho buscou compreender os mecanismos fisiológicos e metabólicos associados a essas respostas diferenciais, ao avaliar a plasticidade frente a flutuações na disponibilidade hídrica em clones de *Eucalyptus* sp. submetidos a um ciclo de encharcamento e secagem.

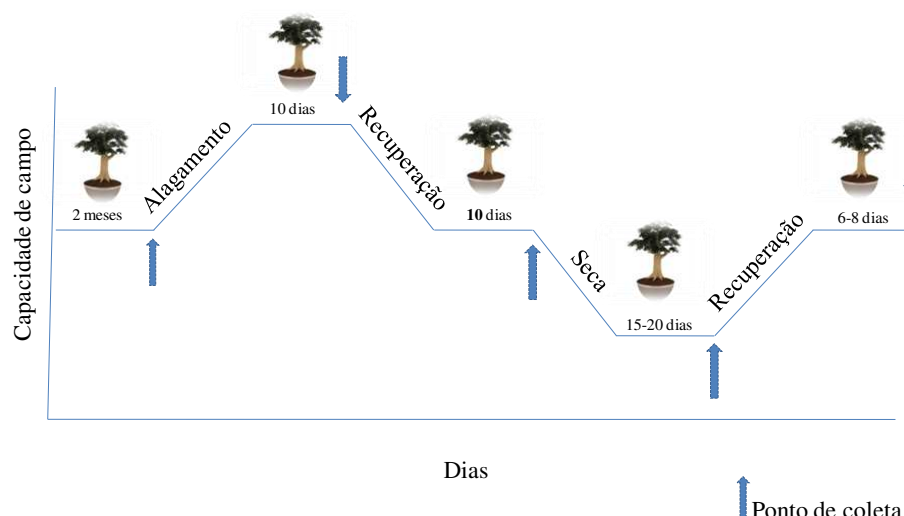
## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- Material vegetal e condições de cultivo**

Clones considerados sensível e tolerante à Seca de Ponteiros do Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) foram gentilmente concedidos pela empresa CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira S.A.). Mudas clonais produzidas por microestaquia de aproximadamente 100 dias foram encaminhadas pela empresa e cultivadas em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG a partir do mês de Janeiro de 2016 (verão). As mudas foram transferidas de tubetes para vasos plásticos com volume de 16 litros contendo substrato comercial Tropstrato HT<sup>®</sup> (a composição química do substrato está disponível no Material Suplementar S1). As mudas passaram por um período de aclimação de 60 dias com irrigação contínua a fim de manter a capacidade de campo. Durante esse período uma adubação contendo monofosfato de amônio (100 mg/dm<sup>3</sup>), cloreto de potássio (100 mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de amônio (55 mg/dm<sup>3</sup>), cloreto de magnésio (50 mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de zinco (4mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de manganês (3mg/dm<sup>3</sup>), ácido bórico (0,81 mg/dm<sup>3</sup>) e sulfato de cobre (1,5 mg/dm<sup>3</sup>) foi realizada mediante aplicação de solução. Os micronutrientes foram aplicados em 3 vezes ao longo de todo o experimento. Uma vez completado esse período de aclimação as plantas foram submetidas a um ciclo de estresse (encharcamento ou seca) permitindo-se a recuperação após cada um dos estresses. O experimento foi encerrado em Maio de 2016 (outono). A temperatura média diária da casa de vegetação ficou em torno de 25 °C, umidade relativa média 80 % e irradiância de 300 μmol de fótons, durante o período experimental.

## 2.2- Imposição do estresse

Após 60 dias de cultivo em casa de vegetação, foram realizadas as medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e coleta de folhas para análises bioquímicas (servindo como ponto de início dos experimentos). No primeiro dia após tais análises iniciais as mudas foram submetidas ao primeiro estresse, encharcamento. Para isso, um segundo vaso foi utilizado para cessar a drenagem proveniente do recipiente em que as mudas estavam inseridas. Nesse sentido, o interior desse segundo vaso foi revestido por um saco plástico e, assim, o vaso contendo a planta foi implantado sobre ele, permitindo a criação de um sistema saturado. Realizou-se a irrigação até saturação completa dos poros do substrato formando uma lâmina de água de aproximadamente 5 cm sobre o mesmo. Devido à evapotranspiração, a lâmina de água precisou ser reposta e isso levou à reoxigenação do sistema, mesmo que em pequena proporção. As mudas foram mantidas por dez dias, tempo suficiente para se observarem nessa condição reduções em *A* e no décimo primeiro dia o segundo vaso foi removido possibilitando a drenagem da água do sistema. Após a recuperação do alagamento, obtida com base na recuperação da fotossíntese a níveis similares aos observados antes da imposição do estresse, submeteu-se as mesmas plantas ao segundo estresse, a seca. Desse modo, cessou-se a irrigação dos vasos até que as plantas atingissem potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) em torno de -2,00 MPa, potencial este onde foi possível observar sintomas visuais de deficiência hídrica, acompanhado pela medição na antemã (3:30 – 5:30 horas) com o auxílio de uma câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, USA). Após esse período, as mudas foram re-irrigadas e a recuperação acompanhada com base nos parâmetros de fotossíntese até alcançar níveis similares aos observados antes da imposição do estresse como ilustrado no esquema a seguir:



**Figura 1**- Esquema envolvendo um ciclo de encharcamento e déficit hídrico. As setas azuis indicam os pontos de coleta.

### 2.3- Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Ao longo da imposição dos estresses os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram mensurados a cada dois dias utilizando um sistema aberto com analisador de gases infravermelho (IRGA, LI-COR Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) com fluorômetro acoplado (LI-COR Inc LI-6400-40, Lincoln, EUA) entre 8:00 e 12:00 h (horário local). Determinou-se a taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), razão entre a concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), transpiração ( $E$ ), utilizando intensidade luminosa artificial de 1400  $\mu\text{mol}$  de fótons, valor esse identificado previamente como o ponto onde a fotossíntese é máxima e 10 % de luz azul, concentração de  $\text{CO}_2$  em torno de 400 ppm, umidade entre 40-70 %, temperatura e vapor de água ambiente utilizando-se “buffer”. Para a determinação da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro acoplado ao IRGA no mesmo momento de medição de  $A$  e respiração noturna ( $R_d$ ). Para tanto, a mesma folha utilizada para as medições de trocas gasosas foi inicialmente submetida a um pulso de luz vermelho-distante ( $1\text{-}2 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, para a estimativa da fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ) foi aplicado um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 1 s. A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz ( $F_0'$ ) e a fluorescência máxima da clorofila ( $F_m'$ ) foram determinadas utilizando o mesmo equipamento simultaneamente a obtenção dos dados de trocas gasosas. A eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), os coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR), foram obtidos usando o mesmo equipamento. A respiração no escuro ( $R_d$ ) foi mensurada 1h:30min após o período de escuro (entre 21:00 e 01:00 h) utilizando-se o mesmo equipamento descrito acima. Para tais análises, foi utilizado o terceiro par de folhas completamente expandido entre o quinto e o sétimo ramo da haste principal.

### 2.4- Coletas para análises bioquímicas

As mesmas folhas utilizadas para as trocas gasosas e fluorescência (conforme descrito no tópico anterior) foram coletadas para os ensaios bioquímicos. As coletas para as análises foram realizadas: antes de iniciar o estresse, após dez dias de encharcamento, recuperação do encharcamento, déficit hídrico (até  $\Psi_w \sim -2,00$  MPa na antemanhã) e recuperação consecutiva. Nesse sentido, em cada época todo o material

vegetal foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80 °C para análises posteriores.

## **2.5- Análises de pigmentos fotossintéticos e bioquímicas**

Alíquotas de aproximadamente 25 a 30 mg de massa fresca macerada em nitrogênio líquido e subsequentemente submetidas à extração metanólica, a quente segundo Lisec et al., 2006, com modificações. Assim, a microtubos de 2,0 mL contendo o material macerado foram adicionados 700 µL de metanol 100 %. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 min a 70 °C sob agitação de 750 rpm. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 13500 rpm por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante (550 µL) foi coletado e armazenado em um novo tubo de 2,0 mL acrescentando-se 375 µL de clorofórmio e 750 µL de água ultrapura. Entre cada adição o material foi novamente homogeneizado e após a adição de água, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C por 15 minutos. Em seguida, 1200 µL da fase aquosa foram coletados e armazenados em um novo tubo de 1,5 mL.

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado conforme previamente descrito (Cross et al., 2006) utilizando-se o pellet remanescente do primeiro tubo após lavagem com metanol. A fração insolúvel em metanol foi ressuspensa em 400 µL de NaOH 0,1 M e então homogeneizada com o auxílio de um vórtex. Os microtubos foram incubados por uma hora a 95 °C sob agitação de 400 rpm. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.300 rpm por 10 min. Uma alíquota de 5 µL do sobrenadante foi então retirada dos microtubos e adicionada a uma microplaca contendo 250 µL de reagente Bradford (1x). A determinação do teor de proteína foi mensurada através de uma curva de calibração contendo albumina de soro bovino (BSA), como padrão.

Os níveis de amido foram determinados segundo Fernie et al., (2001) com modificações, a partir do mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas. A fração insolúvel previamente ressuspensa em NaOH 0,1 M foi neutralizada com ácido acético 1M. A mistura para hidrólise do amido continha as enzimas amiloglucosidase (0,14 unidades µL<sup>-1</sup>) e α-amilase (0,01 U µL<sup>-1</sup>) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A essa mistura (60 µL do *mix* de hidrólise do amido) foram adicionadas 40 µL de suspensão e incubada a 55 ° C durante 60 min em microplacas. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas durante 10 segundos e em seguida 15 µL da suspensão foram transferidas para uma nova placa onde foi adicionado a cada poço 35 µL de metanol e 160 µL de uma mistura contendo tampão HEPES / KOH 1M, pH 7,0, MgCl<sub>2</sub>

(30 mM), ATP (60 mg/mL), NADP (36 mg/mL) e glucose-6-fosfato desidrogenase (0,7 U/reação). A determinação dos teores de glicose (amido hidrolisado) foi realizada com o uso de um leitor de microplacas, com leituras a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez que as leituras estavam estáveis, iniciou-se a reação adicionando hexoquinase (2 U/poço). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a seguinte equação:  $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$  e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de glicose por grama de massa seca ( $\text{g}^{-1}$  de MS).

Os aminoácidos totais foram mensurados como descrito por Cross et al., (2006). Para tanto, um *mix* contendo tampão citrato 1M, pH 5,2 com ácido ascórbico a 0,2 % (m/v), 25  $\mu\text{L}$  de extrato metanólico, 25  $\mu\text{L}$  de metanol e 100 mL de solução de ninhidrina a 1 % (m/v em etanol a 70 %) foi adicionada a uma microplaca que foi incubada no escuro durante 20 min a 95 ° C e após o resfriamento foi centrifugada por 10 segundos. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação do teor total de aminoácidos, foi realizada uma curva de calibração utilizando leucina como padrão. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de MS.

Os níveis de glicose, frutose e sacarose foram determinados no extrato solúvel em metanol e água segundo metodologia descrita previamente (Fernie et al., 2001), com adaptações. Para tanto, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de extrato metanólico a uma mistura contendo tampão HEPES / KOH 0,1 M pH 7,  $\text{MgCl}_2$  (3 mM), ATP (60 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), NADP (36 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e glucose -6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (0,7U / reação). As leituras cinéticas das absorvâncias foram realizadas a 340 nm, com intervalos de um minuto entre as leituras. Após a estabilização das absorvâncias, adicionou-se hexoquinase (1,5 U / reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U / reação) e invertase (5U / reação) para determinar glicose, frutose e sacarose, respectivamente. Para calcular a concentração dos respectivos açúcares utilizou-se a seguinte equação  $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$ .

Para quantificação dos pigmentos fotossintéticos, outra alíquota entre 20-30 mg foram pesadas e submetidas à extração etanólica a quente e a quantificação efetuada conforme descrito previamente por Wellburn, 1994.

## **2.6- Determinação da biomassa seca**

Ao término do experimento as plantas foram divididas em folha, caule, ramos e raiz. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas à estufa com circulação forçada de ar a 70°C e após atingir massa constante foi determinada a massa seca (MS).

## 2.7- Determinação da área foliar específica

Para a determinação da área foliar específica (AFE), ao final do ciclo de seca foram coletados quinze discos foliares ( $A=1,0297 \text{ cm}^2$ ) de cada planta, e levadas à estufa de circulação forçada de ar a  $70^\circ\text{C}$  até atingirem peso constante, aproximadamente 72h. A AFE foi determinada segundo (Hunt, 1982) empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{AFE (m}^2\text{Kg}^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos (m}^2\text{)}}{\text{massa seca dos discos (Kg)}}$$

## 2.8- Determinação do Teor Relativo de Água (TRA)

O *status* hídrico também foi acompanhado pelo teor relativo de água (TRA). Assim, ao atingirem  $\Psi_w \sim -2,00 \text{ Mpa}$  foram coletadas aproximadamente quinze discos foliares ( $A=1,0297 \text{ cm}^2$ ) ao longo de toda a planta. Após essa retirada, os discos foram pesados para determinação da massa fresca (MF) sendo em seguida acondicionadas em placas de Petri contendo água destilada por um período de quatro horas. Posteriormente, o excesso de água dos discos foi retirado para obtenção da massa túrgida (MT). De posse dessa massa, os discos foram secos em estufa de circulação forçada de ar até obtenção da massa seca (MS). Uma vez obtido esses valores, o TRA foi mensurado segundo Cairo (1995), dado pela seguinte fórmula:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{\text{MF-MS}}{\text{MT-MS}} * 100$$

## 2.9- Taxa de crescimento relativo em altura

Ao longo do experimento a altura foi mensurada com o auxílio de uma régua graduada desde a região basal (coleta) até a gema apical. A taxa de crescimento relativo em altura foi calculada de acordo com Hunt (1982).

## 2.10- Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se doze plantas de cada clone, sendo aleatoriamente divididos entre tratamentos e controles da seguinte forma: seis mudas do Clone Tolerante Controle (CTC), Clone Tolerante Tratamento (CTT), Clone Sensível Controle (CSC) e Clone sensível Tratamento (CST) perfazendo um total de vinte e quatro plantas. Foi adotado um esquema fatorial  $2 \times 2$  (dois clones e dois regimes hídricos) em delineamento inteiramente casualizado contendo seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e,

para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % ( $P < 0,05$ ).

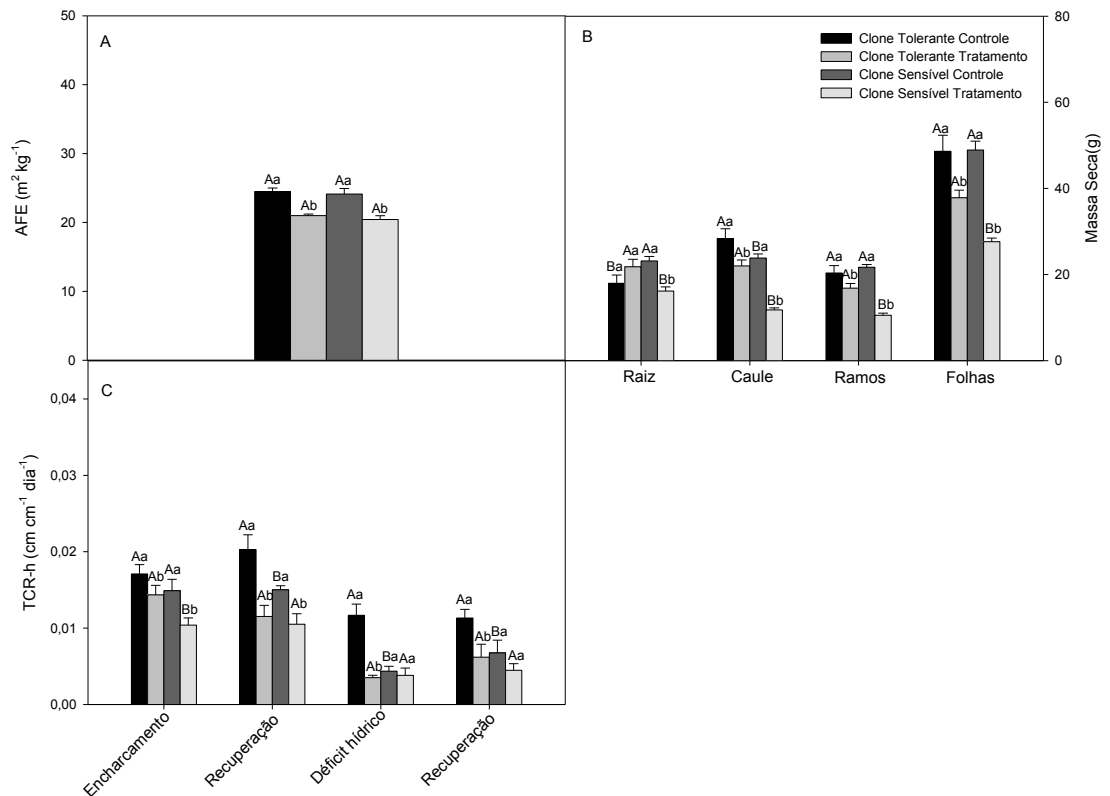
### **3- RESULTADOS**

#### **3.1- Área foliar específica (AFE), alocação de biomassa e taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h)**

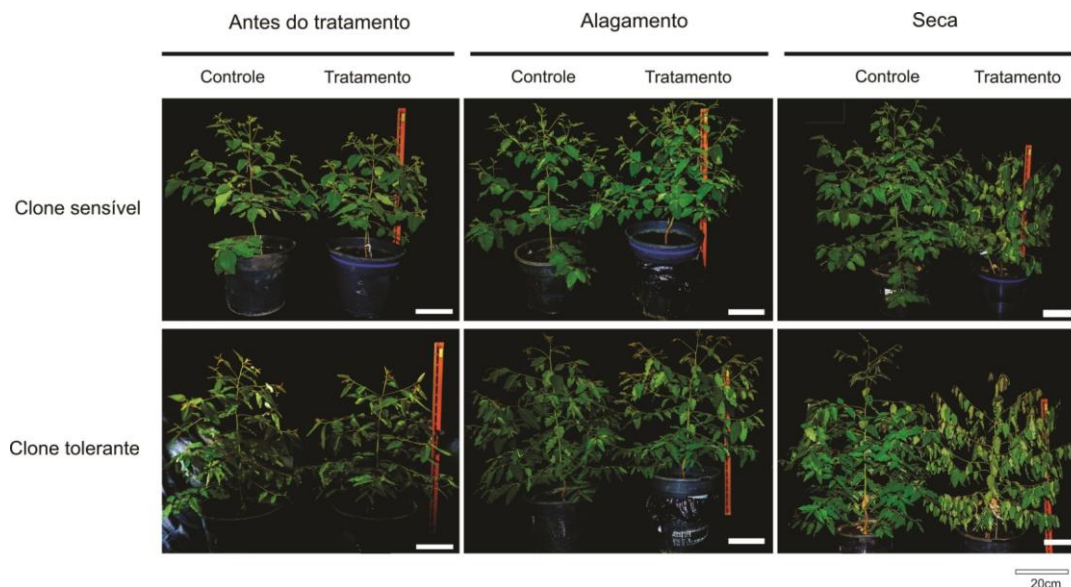
Após o ciclo de seca, discos foliares foram coletados com o intuito de se determinar a AFE. Observou-se que a AFE foi reduzida em ambos os clones após um ciclo de encharcamento e secagem (Figura 1A).

Em relação à alocação da biomassa, de modo interessante, a massa seca da raiz (MS Raiz) (Figura 1B) foi maior no CTT e menor no CST. A massa seca do caule (MSC) e dos ramos (MS Ramos) (Figura 1B) foi reduzida em função dos tratamentos sendo ainda menor no CST comparado ao respectivo controle e ao clone tolerante (Figura 1B). A massa seca foliar (MSF) seguiu tendência similar ao observado para a massa de caule e ramos (Figura 1B). Salienta-se também que após o período de seca houve queda de folhas em ambos os clones o que justifica, ao menos em parte, esse resultado.

A TCR-h (Figura 1C) foi menor para o CTT quando comparado ao controle ao longo de todo experimento. Durante o encharcamento a TCR-h foi menor no CST em relação ao CTT. O crescimento dos materiais foi comprometido ao longo dos estresses (Figura 2).



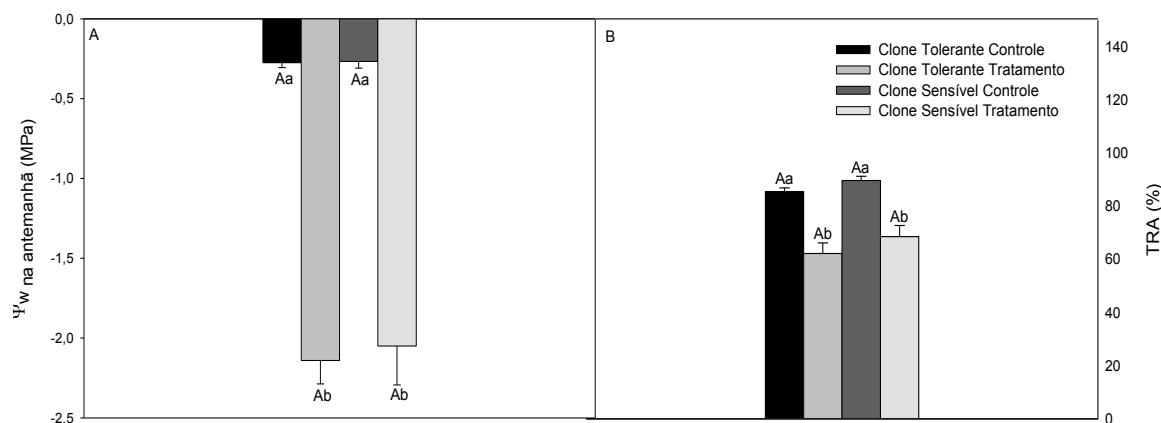
**Figura 1-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico na área foliar específica (A), matéria seca de raiz, caule, ramos e folhas (B) e taxa de crescimento relativo em altura (C) em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.



**Figura 2-** Clones de eucalipto considerados sensível e tolerante à SPEVRD antes da imposição do estresse, após o período de encharcamento e déficit hídrico. Após a deficiência hídrica nota-se que o clone sensível apresenta um menor tamanho em relação ao controle e sintomas associados a SPEVRD não foram evidenciados.

### 3.2- Teor relativo de água (TRA) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ )

Durante o ciclo de deficiência hídrica o  $\Psi_w$  foi acompanhado na antemanhã e ao atingir  $\Psi_w \sim -2,00$  MPa (Figura 3A) discos foliares foram coletados para determinação do TRA. O TRA foi reduzido em ambos os clones submetidos aos tratamentos (Figura 3B). Registre-se também que o CTT durante limitação hídrica atingiu esse  $\Psi_w$  mais rapidamente que o CST (seis dias antes) .



**Figura 3-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico no potencial hídrico foliar e teor relativo de água em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Potencial hídrico foliar (A) e teor relativo de água (B). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

### 3.3- Trocas gasosas e fluorescência da clorofila $a$

É possível notar que antes dos clones serem submetidos ao encharcamento não se observou diferença entre os tratamentos para os parâmetros de taxa fotossintética ( $A$ ) (Figura 4A), condutância estomática ( $g_s$ ) (Figura 4B), razão  $C_i/C_a$  (Figura 4C), transpiração ( $E$ ) (Figura 4D), *quenching* fotoquímico  $qP$  (Figura 4E) taxa de transporte de elétrons ETR (Figura 4F), , respiração noturna ( $R_d$ ) (Figura 5A) e rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) (Figura 5B). Em síntese, os clones utilizados apresentavam parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila  $a$  semelhantes na ausência de estresse.

Sob encharcamento observou-se que o CTT apresentou reduções em  $A$  mais rapidamente que o CST, ambos persistindo até o final do estresse (10 dias). Após a remoção do excesso de água, a recuperação do CTT foi mais lenta que o CST, no entanto, houve a recuperação de  $A$ , atingindo valores semelhantes aos controles (Figura 4A). Em condições de deficiência hídrica o CTT mais uma vez apresentou reduções

mais rápidas que o CST perfazendo uma diferença de seis dias entre os clones. Após o quarto dia de reidratação tanto o CTT quanto o CST se recuperaram atingindo valores de  $A$  semelhantes a seus controles.

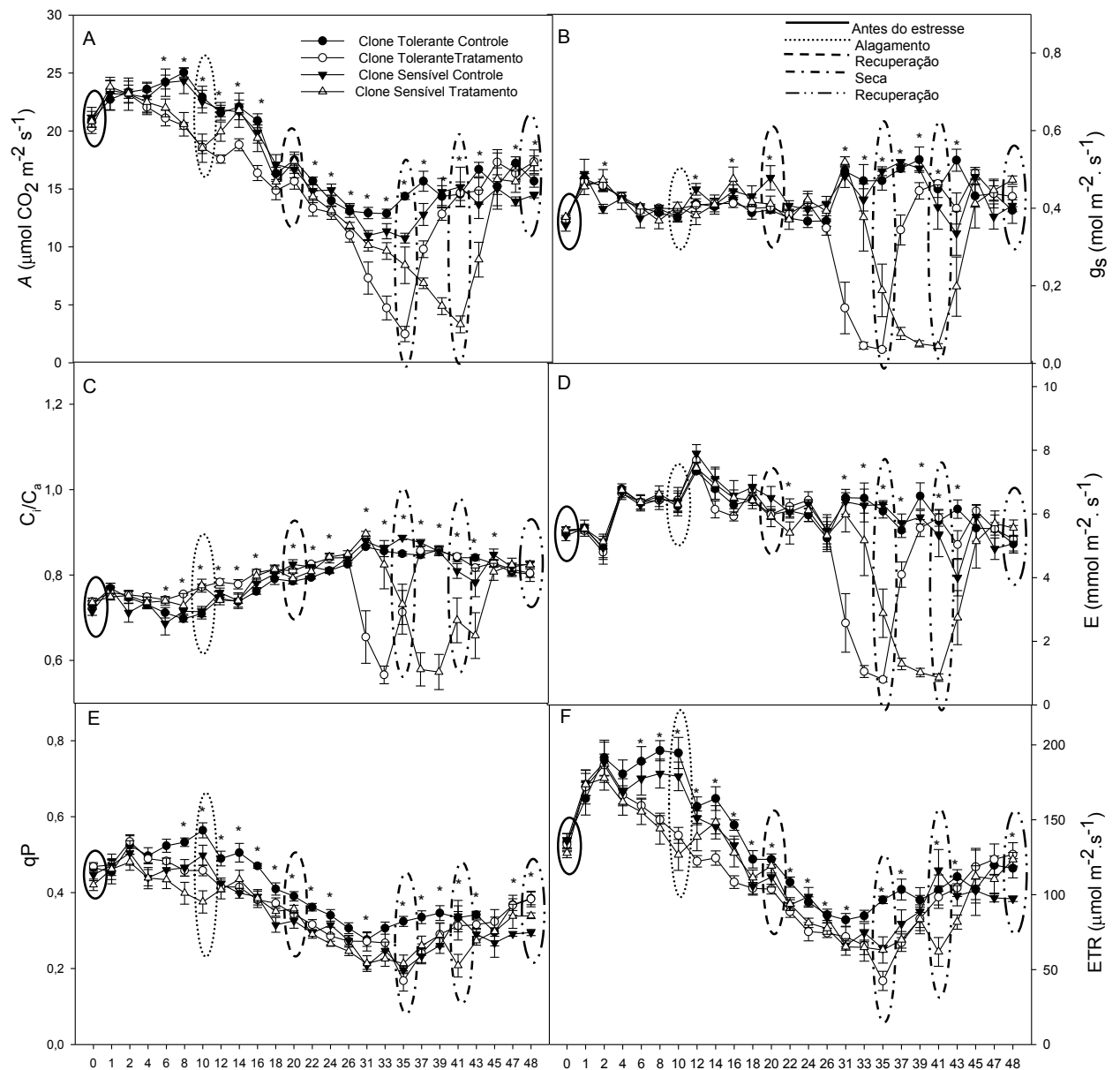
A  $g_s$  não sofreu alterações após dez dias de encharcamento. Sob seca, o CTT sofreu diminuições em  $g_s$  mais precocemente quando comparado ao CST. A recuperação completa em  $g_s$  ocorreu no sexto dia para o CTT e no quarto dia para o CST, sendo mantida até o final do ciclo (Figura 4B).

A razão  $C_i/C_a$  foi alterada a partir do sexto dia de encharcamento no CST e a partir do oitavo dia no CTT, sendo possível notar incrementos em relação ao controle. No oitavo dia de recuperação não se observaram diferenças, embora no décimo dia sejam notadas pequenas reduções no CST. Em condições de déficit hídrico, tanto o CTT quanto o CST reduziram a razão  $C_i/C_a$  perdurando até o final da seca. Com a reidratação, a razão  $C_i/C_a$  obteve incrementos ao longo dos dias, recuperando totalmente na última avaliação (Figura 4C).

A  $E$  não reduziu durante os dez dias de encharcamento e também não variou durante o período em que foi removido o excesso de água. Os tratamentos começaram a causar reduções nessa variável após a imposição do déficit hídrico para ambos os clones. Com a irrigação das plantas os valores sofreram incrementos não havendo mais diferenças entre eles e os controles (Figura 4D).

Reduções no *quenching* fotoquímico ( $qP$ ) para ambos os clones foram observadas no oitavo dia de encharcamento e tais diminuições persistiram ao longo da recuperação no CTT. Ao final do período de déficit hídrico esses declínios novamente foram notados nos dois materiais; no entanto, com a retomada da irrigação essas diferenças não foram mais observadas e ambos os clones durante os tratamentos atingiram valores semelhantes ao controle. Destaca-se que o CST submetido ao déficit hídrico apresentou reduções nesse parâmetro somente no último dia de seca (Figura 4E).

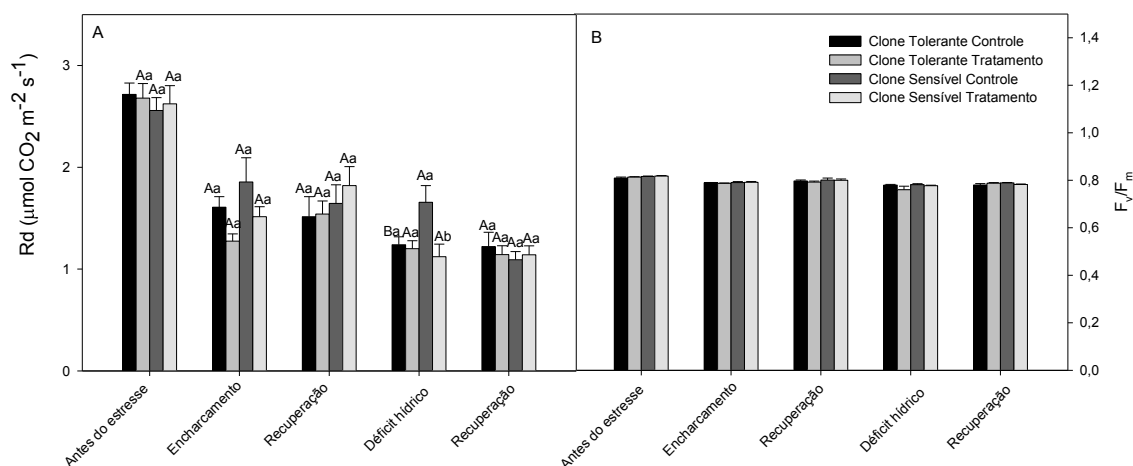
A ETR das plantas dos tratamentos CTT e CST começou a sofrer reduções com seis e oito dias de encharcamento, respectivamente, prosseguindo até o décimo dia desse mesmo estresse. Até o último dia da remoção do excesso de água ainda foi possível notar reduções no CTT persistindo até o sexto dia de seca ao passo que a partir desse momento houve uma recuperação dos parâmetros de ETR. Ao final do ciclo de seca para ambos os tratamentos reduções em ETR foram notadas, no entanto recuperando-se completamente após a reidratação (Figura 4F).



**Figura 4-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial à SPEVRD. Taxa fotossintética (A); condutância estomática (B); razão  $C_i/C_a$  (C); transpiração (D); *quenching* fotoquímico (E), taxa de transporte de elétrons (F). Os asteriscos indicam os pontos onde foi observada diferença entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

A respiração no escuro ( $R_d$ ) foi virtualmente invariante ao longo dos estresses para os clones e apresentou pequena diferença apenas no período de déficit hídrico, sendo menor no CST (Figura 5A).

Embora variações nos diferentes parâmetros de trocas gasosas tenham sido observadas, não se evidenciaram alterações nos valores de  $F_v/F_m$  durante ciclos de encharcamento e secagem (Figura 5B).



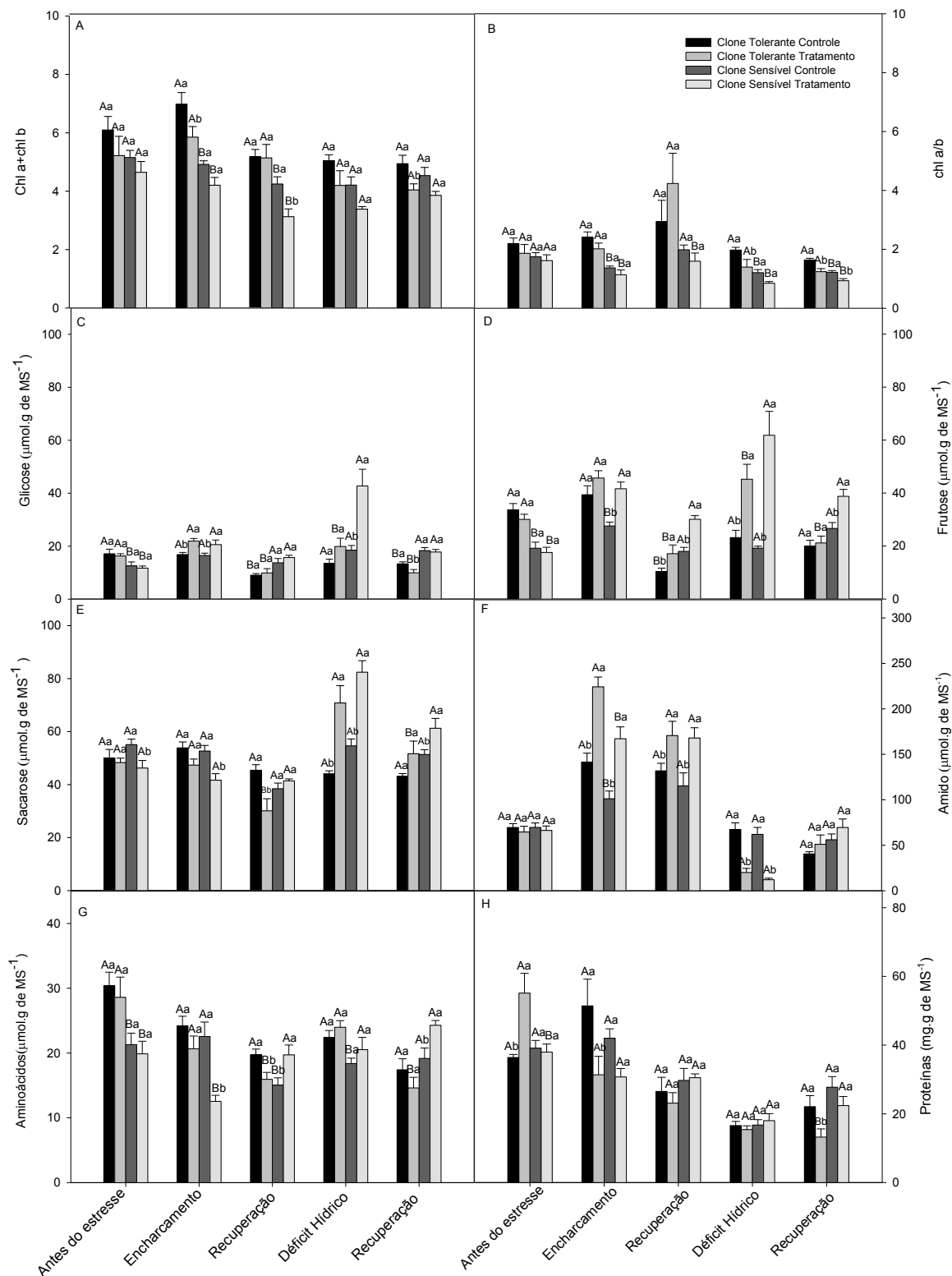
**Figura 5-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial à SPEVRD. Respiração noturna (A) e rendimento quântico do PSII,  $F_v/F_m$  (B). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

### 3.4- Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais

A fim de melhor compreender as variações no padrão das trocas gasosas o teor de clorofilas foi mensurado em pontos chave do estresse. Nesse sentido, diminuições nas clorofilas totais foram observadas para o CTT ao final do encharcamento, sendo essa recuperada com a remoção do excesso de água. Por outro lado, quedas nos níveis de clorofilas totais durante o período de recuperação foram observadas para o CST. Durante o déficit hídrico os níveis de clorofilas totais não se alteraram, no entanto a retomada da irrigação promoveu reduções para o CTT (Figura 6A).

A razão clorofila (chl) *a/b* não apresentou diferenças entre plantas submetidas ou não aos dez dias de encharcamento, embora valores menores tenham sido observados para o CSC e CST. Reduções nessa razão foram notadas para o CTT ao final do período de seca, persistindo até o final da recuperação, enquanto reduções para o CST foram observadas somente ao final da recuperação (Figura 6B).

O metabolismo do carbono também foi analisado buscando entender melhor os efeitos provocados pelo estresse. Com isso, foi observado que os níveis de glicose e frutose antes da imposição do excesso de água não diferiram entre os clones sujeitos aos tratamentos, no entanto, notou-se que os CSC e CST apresentaram níveis menores em relação ao CTC e CTT. Ao final de dez dias de encharcamento incrementos nos níveis de glicose nos tratamentos foram observados em ambos os clones. Sob a mesma condição de estresse, os níveis de frutose foram maiores no CST em relação ao CSC ao passo que houve uma redução nos níveis de sacarose para esse mesmo clone. De modo interessante, com a remoção do excedente de água foi observada a recuperação nos níveis de glicose, incrementos em frutose e ainda reduções nos níveis de sacarose para o CTT. Durante o déficit hídrico o CST apresentou incrementos nos níveis de glicose conquanto os níveis de frutose e sacarose aumentaram em ambos os clones. Ademais, a reidratação do solo culminou com reduções em glicose no CTT, aumentos em frutose e sacarose no CST embora em menor proporção quando comparado à seca (Figuras 6C, 6D e 6E).



**Figura 6-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico nos níveis de clorofilas, açúcares solúveis e amido em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Clorofilas totais (A), razão chl *a/b* (B), glicose (C), frutose (D), sacarose (E), amido (F), aminoácidos solúveis totais (G) e proteínas totais (H). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

De modo interessante, os níveis de amido não diferiram entre os clones antes do estresse (Figura 6F). No entanto, após o período de encharcamento incrementos em

ambos os clones foram observados. Durante o período de recuperação os níveis de amido foram ainda altos, sugerindo uma menor degradação. Mediante a deficiência hídrica, ambos os clones reduziram seus níveis de amido. Após a retomada da irrigação (recuperação), os níveis de amido se aproximaram de seus respectivos controles em ambos os clones (Figura 6F).

Antes da imposição do estresse, o CST apresentou menores níveis de aminoácidos totais em relação ao CTT (Figura 6G). Durante o encharcamento notou-se redução nos níveis de aminoácidos no CST; porém, durante a recuperação houve quedas nos níveis de aminoácidos no CTT e aumentos no CST. Sob deficiência hídrica os aminoácidos totais não diferiram entre os tratamentos. Por outro lado, durante a recuperação desse estresse foram observados incrementos nos níveis de aminoácidos para o CST em relação ao CSC e também em relação ao CTT (Figura 6G).

Além disso, os níveis de proteínas solúveis totais foram maiores para o CTT em relação ao CTC e ao CST antes de iniciar os estresses. Não obstante, esses maiores níveis foram reduzidos em situação de encharcamento. Durante a recuperação não se evidenciaram diferenças entre os tratamentos no que refere os níveis de proteínas, o que foi também observado ao final da seca. Com a reidratação desses materiais observaram-se reduções para o CTT em relação ao CTC e também ao CST (Figura 6H).

#### 4- DISCUSSÃO

O encharcamento promoveu alterações em  $A$  no clone tolerante sem, no entanto, alterar  $g_s$  e  $E$  (Figuras 4A, 4B e 4D). Não obstante, é possível observar incrementos na razão  $C_i/C_a$  indicando a ocorrência de limitações bioquímicas à fotossíntese (Figura 4C). Em paralelo, reduções tanto em  $ETR$  quanto em  $qP$  foram observadas nas plantas submetidas aos tratamentos sugerindo a ocorrência de limitações do processo fotoquímico (Figuras 4E e 4F). Em trabalhos realizados com *Distylium chinense*, um arbusto considerado tolerante a inundações, após quinze dias de alagamento houve reduções em  $A$ ,  $qP$ ,  $ETR$  e  $F_v/F_m$  e incrementos em  $C_i$ ; no entanto, quedas em  $g_s$  e  $E$  foram notadas após trinta dias (Liu et al., 2014). Esses mesmos autores ainda observaram que tanto a fotossíntese quanto limitações estomáticas diminuíram ao longo do estresse e que incrementos na concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ) foram observados indicando que as reduções na fotossíntese foram provocadas, em larga escala, por limitações não estomáticas. Esses mesmos clones utilizados no presente trabalho quando submetidos à hipoxia apresentaram quedas em  $g_s$  e  $A$  e cabe ressaltar que o clone tolerante apresentou uma resposta mais rápida em relação ao clone sensível

(Lacerda, 2013). Cumpre mencionar também que os níveis de sacarose não sofreram aumentos expressivos no CTT; no entanto, o acúmulo de amido sofreu largos incrementos sob encharcamento (Figuras 6E e 6F). O acúmulo de amido em plantas submetidas ao alagamento foi também observado em espécies como girassol (*Helianthus annuus* L.) (Wample & Davis, 1983) e em maçã (*Syzygium samarangense* Merr. Et Perry) (Hsu, 1999) em resposta ao excesso hídrico. Em decorrência de deficiência de O<sub>2</sub> o acúmulo de amido pode estar associado à menor translocação de açúcares no floema em função de uma diminuição no metabolismo radicular que seria um dreno, particularmente em plantas jovens (Wample e Davis, 1983). Nesse sentido, a redução da força do dreno culminaria em incrementos nos níveis de sacarose nos tecidos foliares promovendo, assim, um acúmulo de trioses-fosfato como resultado de uma inibição por *feedback* (Herold, 1980). Em adição, essas trioses-fosfato presentes no citoplasma promovem a síntese de amido devido aos largos aumentos na disponibilidade de substrato (Herold, 1980). Espécies consideradas tolerantes ao excesso hídrico apresentam certa plasticidade a essa condição sendo possível ajustar sua fisiologia levando a uma aclimatação metabólica dentre outras alterações (Voesenek & Bailey-Serres 2013). Tomados em conjunto, esses dados indicam a ocorrência de limitações bioquímicas à fotossíntese em clones de eucalipto e que essa promove efeitos também sobre a fase fotoquímica da fotossíntese corroborando para a hipótese de retroinibição, que limitaria o crescimento em condições de excesso hídrico.

Durante encharcamento, o CST apresentou reduções nos parâmetros de trocas gasosas semelhantes as do CTT quando comparado ao controle. No entanto, naquele material o *qP* atingiu valores menores que o CTT (Figura 4E). Essa queda na dissipação fotoquímica foi acompanhada por diminuições nos níveis de sacarose seguidas por aumentos em glicose, frutose e amido (Figuras 6C, 6D, 6E e 6F). Ademais, a redução nos níveis de sacarose foi acompanhada por aumentos nos níveis de amido e de redução na taxa de crescimento relativo no CST (Figura 1C). Diante disso, pode-se inferir que a reserva acumulada pelo CST estaria sendo usada, ao menos parcialmente, para a manutenção de processos durante essa condição. Cumpre mencionar que amilases, em algumas plantas e tecidos, podem ser ativadas durante períodos de alagamento ou também de baixa concentração de oxigênio convertendo amido em glicose (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Reduções nos níveis de clorofilas totais associadas à manutenção na razão chl *a/b* no CTT sugerem que a queda em *A* esteja mais associadas a uma retroinibição do que a uma limitação na absorção de energia (Figura 6A e 6B). De modo similar, foi observado

em guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb.), uma espécie arbórea comum em ambientes alagados, reduções das clorofilas totais,  $A$ ,  $F_v/F_m$  e ETR e  $qP$  após quinze dias de saturação hídrica (Oliveira & Joly, 2010). Reduções nos níveis de aminoácidos totais sem alterações em proteínas totais foram observadas para o CST, ao passo que o contrário foi observado para o CTT (Figuras 6G e 6H). Aparentemente esses resultados sugerem a ocorrência de uma extensa reprogramação metabólica em ambos os clones com o intuito de manter a disponibilidade de energia mediante essa condição. Em consonância com essa hipótese foi observado que, em carvalho (*Quercus robur*), uma espécie considerada tolerante ao alagamento, o excesso de água no 26° e 34° dia de tratamento promoveu reduções nos níveis de aminoácidos nas primeiras folhas (Alaoui-Sossé et al., 2005).

Com a remoção do excesso de água a  $A$  em ambos os clones sob encharcamento foi recuperada; no entanto, tanto a ETR quanto o  $qP$  permaneceram baixos após a recuperação no CTT ao passo que a razão  $C_i/C_a$  apresentou ligeiras quedas no CST (Figuras 4A, 4E e 4F). Em pinhão-manso (*Jatropha curcas*) embora o alagamento tenha promovido diminuições em  $A$ ,  $E$  e  $g_s$ , com a retirada do estresse houve uma parcial recuperação desses parâmetros mantendo-se todavia ainda abaixo dos valores observados para o controle (Verma et al., 2014). Em *Tabebuia aurea* a  $A$ ,  $g_s$  e  $E$  também diminuíram com o decorrer do alagamento (48 dias), porém após a drenagem a recuperação foi quase completa atingindo valores próximos ao controle em um período de recuperação de dez dias (Oliveira & Gualtieri, 2016).

Os efeitos da deficiência hídrica nos parâmetros de trocas gasosas foram bastante pronunciados (Figura 4). Ademais, é reconhecidamente sabido que a fotossíntese e transpiração podem ser limitadas, ao longo da deficiência hídrica, por reduções na condutância estomática promovendo, assim, incrementos na eficiência do uso da água (Xu et al., 2010). Sendo assim, a imposição do segundo estresse, seca, promoveu reduções em  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i/C_a$ , ETR e  $qP$  em ambos os clones bem como em  $R_d$  no CST. Como já mencionado anteriormente o clone tolerante submetido aos tratamentos apresentou diminuições nos parâmetros de trocas gasosas e do  $\Psi_w$  mais rapidamente que o clone sensível, indicando uma resposta mais precoce desse material. Não obstante, esse efeito parece estar associado ao maior tamanho dessas plantas, o que contribui também para uma maior demanda transpiratória. Nesse contexto, ao se avaliar clones de *Eucalyptus globulus* em condições de deficiência hídrica foi possível verificar que um grupo apresentou menor crescimento e também um alto controle estomático, ao passo que outro grupo resistiu à perda de água e dentre as modificações observadas ressalta-se

o menor ajuste estomático (Granda et al., 2014). Esses mesmos autores mencionam que o primeiro grupo apresenta mecanismos que limitam as perdas de água (ajuste estomático) ao passo que o segundo apresenta um comportamento denominado “*gastador de água*”, que está associado a aumentos em  $E$  e  $A$  com a manutenção do crescimento.

De modo geral, a deficiência hídrica compromete de forma considerável o rendimento da grande maioria das culturas (Nezhadahmadi et al, 2013). Em particular, grandes culturas (e.g. palmeiras produtoras de óleo) nota-se que a imposição de estresse por seca em um largo período (57 dias) também reduziu  $A$  e  $g_s$  em dois híbridos testados concomitantemente com aumentos em  $C_i/C_a$  (Silva et al., 2016). Em condições de déficit hídrico foi observado em girassol observa-se, usualmente, uma redução no conteúdo de amido em paralelo com acúmulo de açúcares solúveis (Turner et al., 1978). Resultados similares foram aqui obtidos (Figura 6C, 6D, 6E e 6F). Aumentos em glicose, frutose, sacarose foram evidenciados no CST enquanto que para o CTT houve incrementos nos níveis de frutose e sacarose e em ambos os materiais houve o declínio de amido. Tal padrão metabólico parece estar associado a um ajuste osmótico possibilitando uma resposta positiva à limitação hídrica. Em adição, ao considerar-se que o CST demorou mais tempo para atingir o  $\Psi_w \sim -2,00\text{MPa}$ , a manutenção de maiores níveis de açúcares solúveis podem ser justificadas, ao menos em parte, pelo maior período que esse clone apresentou para se ajustar ao estresse. Cumpre ressaltar também que plantas sob deficiência hídrica quando são novamente hidratadas podem reciclar a sacarose de modo a promover o crescimento (Merchant et al., 2006). Em clones de *E. globulus* com sensibilidade diferencial à seca, o crescimento foliar foi comprometido e associado à incrementos nos níveis de açúcares solúveis para ambos os clones (Shvaleva et al., 2005). Ademais, observou-se que em *E. globulus*, *E. smithii* e *P. radiata* submetidos à seca houve uma exaustão de amido nas folhas, no entanto para o eucalipto esse efeito foi balanceado pelo acúmulo de açúcares solúveis (Mitchell et al., 2013). Neste mesmo trabalho foi observado ainda que a respiração noturna não foi alterada sugerindo, pois, que o requerimento por carboidratos no tecido foliar culminou com a redução dos teores de amido. Cabe destacar ainda que a deficiência hídrica pode promover ajustamento osmótico pelo acúmulo de compostos osmoprotetores como prolina e açúcares solúveis (Mohammadkhani & Heidari, 2008). Tomados em conjunto, esses dados indicam a possível ocorrência de ajustamento osmótico no clone tolerante a SPEVRD. De todo modo, estudos mais detalhados devem ainda ser realizados para explicar em que extensão tais ajustes proporcionam essa maior tolerância.

Com a reidratação do solo os clones recuperaram todos os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência, indicando uma adequada plasticidade desses materiais (Figura 4). Nesse contexto, a recuperação em  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i/C_a$  também foi notada com a retomada da irrigação em mogno-africano (*Khaya ivorensis*) (Albuquerque et al., 2013). Não somente os parâmetros de trocas gasosas, mas também os níveis de amido foram recuperados após a reirrigação, atingindo valores semelhantes aos controles (Figura 6F). Por outro lado, o conteúdo de glicose sofreu ligeiras diminuições no CTT e aumentos de frutose e sacarose foram ainda observados no CST sendo maior em relação ao controle e também ao CTT (Figuras 6C, 6D e 6E). Tomados em conjunto esses dados indicam que com a reidratação uma menor degradação desses açúcares acontece favorecendo, portanto, o transporte desses açúcares que poderiam estar sendo destinados para manter certas funções (e.g., crescimento). De modo similar ao aqui observado, os teores de amido também se recuperaram em genótipos de algodão, com tolerância diferencial à seca, atingindo valores próximos ao controle ao passo que os açúcares solúveis e redutores apresentaram uma tendência de redução após a reidratação (Parida et al., 2007).

Após todo o ciclo de estresses as plantas foram divididas em folhas, ramos, caule e raiz sendo levadas à estufa de circulação forçada de ar a 70 °C para obtenção da massa seca dos órgãos (Figura 1B). Foi observado que a massa seca das folhas, ramos e caule das plantas submetidas aos dois estresses foi reduzida em ambos os clones sendo reduzida ainda mais no CST assim como a TCR-h (Figuras 1B e 1C). O primeiro mecanismo desencadeado durante a deficiência hídrica é uma diminuição do crescimento de tecidos em expansão (Tardieu, 2014) em decorrência de uma menor pressão de turgescência (Anjum et al., 2011). Cabe mencionar também que após a seca houve queda de folhas, para ambos os clones, o que pode ter alterado a massa foliar. Em genótipos de *Betula L.* notou-se uma forte abscisão foliar mediante ao déficit hídrico e vale destacar que a espécie *B. papyrifera* foi a mais afetada (Gu et al., 2007). Esses autores sugerem que esse efeito leva a uma menor perda de água, ao reduzir a superfície transpirante. De modo interessante, a massa do sistema radicular do CTT foi maior em relação ao controle e ao CST (Figura 1B). Mudanças no sistema radicular como o aumento da biomassa e maior profundidade parece ser um ponto importante na definição de espécies pertencentes a lugares que passam por períodos de inundações e com deficiência hídrica subsequente (Lopez & Kursar, 2003). Nesse sentido, a formação de raízes em solo sob excesso hídrico parece ser mais relevante que a própria tolerância a essa condição permitindo determinadas espécies tolerar essas flutuações hídricas

(Lopez & Kursar, 2007). Esse maior investimento em raiz em detrimento da parte aérea mediante essas situações parece ser o fator preponderante na tolerância observada para esse material a SPEVRD podendo estar associada a uma regulação anterior à exposição do estresse.

Tomados em conjunto, os resultados aqui obtidos indicam que as respostas fisiológicas e metabólicas, tanto do clone sensível quanto do clone tolerante, foram semelhantes, porém em diferentes magnitudes. Todavia, é importante mencionar que embora a resposta para ambos os clones mediante cada estresse tenha sido de certa forma similar diferenças no modo de percepção de cada material e a forma como eles “suportaram” cada estresse foram evidentes. Registre-se também que o estudo ora realizado teve como foco principal avaliar os efeitos do encharcamento e da seca em clones ditos tolerante e sensível a SPEVRD, o que possivelmente está relacionada a ocorrência desses dois eventos em campo, de modo específico, ou seja, em uma sequência capaz de induzir tal anomalia. No entanto, sintomas característicos dessa anomalia não foram aqui observados, o que pode ser justificado, ao menos parcialmente, pela idade e tamanho das plantas. Em condições de campo, tais sintomas são evidenciados em plantas mais desenvolvidas (ou adultas) sugerindo que materiais que passam por estresses consecutivos (ou ciclos repetidos de estresse) ao longo de seu desenvolvimento são capazes (ou não) de desenvolver mecanismos capazes de conferir tolerância diferencial. Assim, estudos futuros devem se concentrar na exposição desses materiais a ciclos sucessivos de encharcamento e seca que devem ser capazes de simular condições mais semelhantes àsquelas observadas no campo. Todavia, os resultados obtidos até o momento indicam que, embora o clone tolerante a SPEVRD apresente reduções precoces nos parâmetros de trocas gasosas e também no  $\Psi_w$  comparadas ao clone sensível, a presença de mecanismos de quiescência, como já observada anteriormente por Harguindeguy 2013 parece ser de suma importância para a tolerância diferencial observada a nível de campo. Além disso, a alocação diferencial de biomassa, destacando-se aumentos expressivos na biomassa radicular, parece auxiliar a uma maior “tolerância” desse clone aos dois eventos sucessivos de estresse (encharcamento e déficit hídrico).

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaoui-Sossé B, Gérard B, Binet P, Toussaint ML, Badot PM** (2005) Influence of flooding on growth, nitrogen availability in soil, and nitrate reduction of young oak seedlings (*Quercus robur* L.). *Annals of Forest. Science.* **62**:593–600.
- Albuquerque MPF, Moraes FKC, Santos RIN, Castro GLS, Ramos EMLS, Pinheiro HA** (2013) Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a déficit hídrico e reidratação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.48, n.1*:9-16.
- Alfnas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF** (2004) Clonagem e doenças do eucalipto 2ª ed. Viçosa, MG: Editora UFV.
- Almeida AQ, Ribeiro A, Leite FP** (2013) Relação entre a seca dos ponteiros do eucalipto e o clima no Vale da Bacia Hidrográfica do Rio Doce. *Espírito Santo do Pinhal, v. 10, n. 1*:005-013.
- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W** (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research Vol. 6(9)*:2026-2032.
- Azizi S, Tabari M, Striker GG** (2017) Growth, physiology, and leaf ion concentration responses to long-term flooding with fresh or saline water of *Populus euphratica*. *South African Journal of Botany* **108**:229–236.
- Bailey-Serres J & Voesenek LACJ** (2008) Flooding stress: Acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology* . **59**:313-339.
- Bailey-Serres J, Lee SC & Brinton E** (2012) Waterproofing crops: Effective flooding survival strategies. *Plant Physiol.* **160**:1698-1709.
- Basak SR, Basak AC, Rahman MA** (2015) Impacts of floods on forest trees and their coping strategies in Bangladesh. *Weather and Climate Extremes* **7**:43–48.
- Cairo PAR** (1995) Curso Básico de Relações Hídricas de Plantas. UESB, Vitória da Conquista.
- Chaves JH, Reis GG, Reis MGF, Neves JCL, Pezzopane JEM, Polli HQ** (2004) Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes. *Revista Árvore, v. 28, n. 3*:333-341.
- Chaves MM & Oliveira MM** (2004) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany,* **55**:2365- 2384.

- Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*. **142**: 1574–1588.
- Else MA, Tiekstra AE, Croker SJ, Davies WJ & Jackson MB** (1996) Stomatal closure in flooded tomato plants involves abscisic acid and a chemically unidentified anti-transpirant in xylem sap. *Plant Physiology*. **112**:239--247.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6- biphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**:250-263.
- Ferreira FA & Milani D** (2002) Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu: Universidade Federal de Viçosa/International Paper, 98 p.
- Ferreira FA** (1989) Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: SIF, 1989. 570p.
- Ferreira, FA** (1986) Principais doenças do eucalipto no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, EPAMIG, 32p. (Boletim Técnico, 23).
- Granda V, Delatorre C, Cuesta C, Centeno ML, Fernández B, Rodríguez A, Feito I** (2014) Physiological and biochemical responses to severe drought stress of nine *Eucalyptus globulus* clones: a multivariate approach. *Tree Physiology* **34**:778–786.
- Gu M, Rom CR** (2007) Effect of Water Deficit on Gas Exchange, Osmotic Solutes, Leaf Abscission, and Growth of Four Birch Genotypes (*Betula L.*) Under a Controlled Environment. *Hort science* **42**(6):1383–1391.
- Harguindeguy I** (2013) Respostas fisiológicas à hipoxia e a manganês em clones de eucalipto com tolerância diferencial à Seca de Ponteiros do Vale do Rio Doce. (Dissertação Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 30p.
- Herold A** (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity- the missing link. *New Phytologist*. **86**:131-144.
- Herrera A** (2013) Responses to flooding of plant water relations and leaf gas exchange in tropical tolerant trees of a black-water wetland. *Frontiers in Plant Science*. **4**:1-12.

- Hsu YM, Tseng MJ, Lin CH** (1999) The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Botanical Bulletin- Academia Sinica TaipeiBot. Bull. Acad. Sin.* **40**:193-198.
- Hunt R** (1982) *Plant Growth Curves: the Functional Approach to Plant Growth Analysis*. Edward Arnold, London.
- IMA Florestal** (2015). Disponível em: <http://www.imaflorestal.com/noticias/eucalipto-no-brasil-02-03-2015>). Acesso em: 10 de Dezembro de 2016.
- Indústria Brasileira de Árvores-Ibá** (2015). Disponível em: [http://iba.org/images/shared/iba\\_2015.pdf](http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf). Acesso em: 20 de Outubro de 2016.
- Kozłowski TT** (1997) Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree physiology On-line Monograph N° 1*. Heron Pub, Victoria, Canada, 29p.
- Lacerda FJP** (2013) Papel da hipóxia e do manganês na tolerância diferencial de clones de eucalipto à Seca de Ponteiro no Vale do Rio Doce. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 94p.
- Leite FP, Novais RF, Silva IR, Barros NF, Neves JCL, Medeiros AGB, Ventrella MC, Villani EMA** (2014) Manganese accumulation and its relation to "eucalyptus shoot blight in the Vale do Rio Doce". *Revista Brasileira de Ciência do Solo* vol.**38** n°1 Viçosa Jan./Feb.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**:387-396.
- Liu Z, Cheng R, Xiao W, Guo Q, Wang N** (2014) Effect of Off-Season Flooding on Growth, Photosynthesis, Carbohydrate Partitioning, and Nutrient Uptake in *Distylium chinense*. *Plos One* 9(9): e107636.
- Lopez OR & Kursar TA** (2003) Does flood tolerance explain tree species distribution in tropical seasonally flooded habitats? *Oecologia* **136**:193–204.
- Lopez OR & Kursar TA** (2007) Interannual variation in rainfall, drought stress and seedling mortality may mediate monodominance in tropical flooded forests. *Oecologia* **154**:35–43.
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH** (2005) Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* **56**:417–423.
- Merchant A, Tausz M, Arndt SK, Adams MA** (2006) Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant, Cell and Environment* **29**: 2017–2029.

- Mitchell PJ, O’Grady AP, Tissue DT, White DA, Ottenschlaeger ML, Pinkard EA** (2013) Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist* **197**: 862–872.
- Mohammadkhani N & Heidari R** (2008) Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties. *World Applied Sciences Journal* **3** (3): 448-453.
- Nezhadahmadi A, Prodhani ZH, Faruq G** (2013) Drought Tolerance in Wheat. *The Scientific World Journal* 2013:610721.
- Oliveira AKM, Gualtieri SCJ** (2016) Gas exchange in young plants of *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae Juss.) subjected to flooding stress. *Revista Árvore, Viçosa-MG*, v.40, n.1:39-49.
- Oliveira VC, Joly CA** (2010) Flooding tolerance of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae): morphological, physiological and growth responses. *Trees* **24**:185–193.
- Parida AK, Dagaonkar VS, Phalak MS, Umalkar GV, Aurangabadkar LP** (2007) Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnol Rep* **1**:37–48.
- Shvaleva AL, Silva FCE, Breia E, Jouve L, Hausman JF, Almeida MH, Maroco JP, Rodrigues JP, Pereira JS, Chaves MM** (2005) Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. *Tree Physiology* **26**: 239–248.
- Silva PA, Oliveira IV, Rodrigues KCB, Come VS, Bastos AJR, Detmann KSC, Cunha RL, Festucci-Buselli RA, DaMatta FM, Pinheiro HA** (2016) Leaf gas exchange and multiple enzymatic and non-enzymatic antioxidant strategies related to drought tolerance in two oil palm hybrids. *Trees* **30**:203–214.
- Sloan JL, Islam MA, Jacobs DF** (2016) Reduced translocation of current photosynthate precedes changes in gas exchange for *Quercus rubra* seedlings under flooding stress. *Tree Physiology* **36**: 54–62.
- Tardieu F** (2014) Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. *Front Physiol.* **18**;4:17.
- Tardieu F** (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience* **337**: 57-67.

- Turner N & Begg, JE & Tonnet, ML.** (1978). Osmotic Adjustment of Sorghum and Sunflower Crops in Response to Water Deficits and Its Influence on the Water Potential at Which Stomata Close. *Functional Plant Biology*. **5**. 597-608.
- Verma KK, Singh M, Gupta RK, Verma CL** (2014) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. *Turk J Bot* **38**: 130-140.
- Voeselek LACJ, Bailey-Serres J** (2013) Flooding tolerance: O<sub>2</sub> sensing and survival strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**:647–653.
- Wample RL, Davis RW** (1983) Effect of Flooding on Starch Accumulation in Chloroplasts of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiology* **73**:195-198.
- Wellburn AR** (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*. **144**:307–313.
- Xu Z, Zhou G, Shimizu H** (2010) Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior* **5(6)**: 649-654.

## CAPÍTULO II

### PLASTICIDADE EM CLONES DE *Eucalyptus* sp. SUBMETIDOS A SUCESSIVOS CICLOS DE ENNCHARCAMENTO E SECAGEM: É POSSÍVEL PLANTAS MEMORIZAR O ESTRESSE?

#### 1- INTRODUÇÃO

As mudanças no ambiente sejam por curtos ou longos períodos, fazem com que as plantas regulem alguns mecanismos determinando a forma como se comportarão frente às condições ambientais posteriores e, nesse contexto, a “memória ao estresse” pode ser um modo de selecionar respostas mais ajustadas (Fleta-Soriano & Munné-Bosch, 2016). Assim, quando uma planta é submetida a um determinado estresse moderado possivelmente essa planta pode desencadear respostas que as tornem mais resistentes quando sujeitas a uma próxima exposição desse mesmo estresse (Crisp et al., 2016). A memória ao estresse ecológico tem sido usualmente definida como “qualquer resposta de uma única planta após uma experiência de estresse que melhore a resposta dessa planta para a experiência a um estresse futuro” (Walter et al., 2013). Tal definição considera que essa memória adquirida ao longo do estresse só pode ser avaliada após esse período onde as plantas encontram-se recuperadas dessa condição (Walter et al., 2013). Em adição, muitas respostas que são mediadas por estresses podem culminar em alterações na metilação do DNA bem como modificações nas histonas, dentre outras alterações (Vriet et al., 2015).

Essa “memória” adquirida pelas plantas pode ser obtida por *priming* ou endurecimento (Bruce et al., 2007). Uma vasta gama de trabalhos têm sido realizados através de pré-tratamentos (*priming*) em determinadas etapas de desenvolvimento da planta a fim de melhorar sua resposta em uma próxima exposição à estresse, como por exemplo, exposições periódicas a seca em *Arabidopsis thaliana* (Ding et al., 2012).

Nesse contexto, ao se analisar os efeitos do *priming* e de mecanismos que as plantas podem adotar ao longo do seu ciclo como, por exemplo, a “memória de estresse” adquirida com ciclos consecutivos de estresse é plausível sugerir que uma anomalia observada em *Eucalyptus* sp. sob condições campo no Brasil possa estar associada a esse mecanismo. Em plantios de eucalipto na região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais foi observado um distúrbio denominado de Seca de Ponteiros do Eucalipto no Vale do Rio Doce (SPEVRD) (Ferreira, 1989). As possíveis causas dessa anomalia parecem estar associadas ao acúmulo de ferro (Fe) e Manganês (Mn) durante períodos

de hipoxia seguidos por períodos de seca (Ferreira, 1986). Não obstante, esse distúrbio é comumente observado após períodos de maior precipitação onde o solo fica encharcado (Almeida et al., 2013). Esses mesmos autores verificaram também que o ano em que houve a segunda maior incidência de SPEVRD foi também caracterizado não somente pela maior precipitação, mas também pela menor precipitação durante o período seco subsequente. Em adição, essa região é caracterizada por apresentar altitude entre 200 a 350 m, temperaturas maiores que 23 °C e solos que apresentam problemas de drenagem temporários (Leite et al., 2014).

Embora diversos estudos já tenham sido realizados para melhor compreender tal fenômeno e ênfase tenha sido dada nos efeitos da hipoxia e excesso de Mn, pouco, ou nada, ainda se sabe acerca das causas desse distúrbio. De modo interessante, clones de eucalipto que se sobressaem nessas condições sendo, portanto, ditos tolerantes e da mesma forma alguns que apresentam maior comprometimento (denominados sensíveis) já foram encontrados em condições de campo. Todavia, pouco ou nada se sabe acerca dos efeitos do encharcamento e déficit hídrico e sua possível relação com a SPEVRD e tampouco as implicações de ciclos consecutivos de estresse na tolerância diferencial desses materiais.

Os efeitos do *priming* durante o desenvolvimento de certas culturas tem sido investigados. Por exemplo, foi demonstrado em trigo (*Triticum aestivum* L.) que uma única exposição ao excesso hídrico não foi capaz de levar a incrementos na tolerância a essa mesma situação em exposições futuras (Li et al., 2011). No entanto, ao se avaliar as respostas do encharcamento nessa mesma espécie exposta ao alagamento antes da antese verificou-se uma melhora na fotossíntese e também no sistema antioxidante (Li et al., 2011). No caso da seca, estudos utilizando *Arrhenatherum elatius* demonstraram que gramíneas submetidas à seca periódica apresentaram uma melhor fotoproteção (Walter, et al., 2011). Em adição, uma pré-exposição ao déficit hídrico em trigo (*Triticum aestivum* L. var. Vinjett) antes da antese levou à reduções na produtividade dos grãos, porém em menor proporção quando comparado à plantas que não passaram por esse processo (Wang, et al., 2014). Tomados em conjunto, é plausível sugerir que uma prévia exposição a um determinado estresse seja capaz de desencadear respostas que possivelmente melhoram o desempenho dessas plantas a outra exposição. No caso específico da SPEVRD observações de campo demonstram que plantas jovens não exibem sintomas típicos dessa anomalia sendo pertinente destacar que a fase crítica compreende os dois primeiros anos após o plantio, contudo, após esse período os

sintomas característicos podem ainda ser notados, porém em menor intensidade (Leite et al., 2014).

No capítulo anterior, evidenciou-se que as estratégias adotadas por ambos os clones em resposta a um ciclo de encharcamento e secagem foram relativamente semelhantes diferindo, basicamente, no tempo e, em alguns momentos, na intensidade de resposta. Em suma, os resultados obtidos indicam que um ciclo de estresse (encharcamento-recuperação-déficit hídrico) promoveu respostas em magnitudes diferentes. Nesse contexto, a presente proposta busca compreender a plasticidade em clones de *Eucalyptus* sp. submetidos a dois ciclos de encharcamento e secagem, sucessivos, em materiais contrastantes (tolerante e sensível) a fim de se investigar como ciclos sucessivos de estresses (encharcamento-deficiência hídrica) são capazes de imprimir uma “memória” nesses clones de modo a garantir uma maior tolerância a essa anomalia considerando respostas fisiológicas e metabólicas.

## **2- MATERIAL E MÉTODOS**

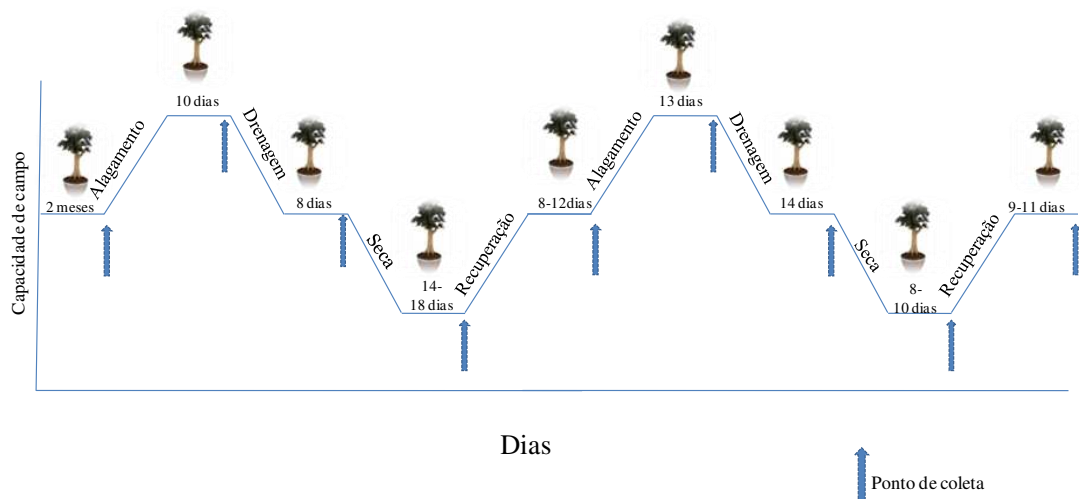
### **2.1- Material vegetal e condições de cultivo**

Clones considerados sensível e tolerante à Seca de Ponteiros do Eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD) foram gentilmente concedidos pela empresa CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira S.A.). Mudanças clonais produzidas por microestaquia de aproximadamente 100 dias foram encaminhadas pela empresa e cultivadas em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG onde foram mantidas em tubete por cinco meses. As mudas foram transferidas de tubetes para vasos plásticos com volume de dezesseis litros contendo substrato comercial Tropstrato HT<sup>®</sup> (a composição química do substrato está disponível na Tabela Suplementar S1) a partir de Agosto de 2016 (Inverno). As mudas passaram por um período de aclimação de 60 dias com irrigação contínua a fim de manter a capacidade de campo. Durante esse período uma adubação contendo monofosfato de amônio (100 mg/dm<sup>3</sup>), cloreto de potássio (100 mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de amônio (55 mg/dm<sup>3</sup>), cloreto de magnésio (50 mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de zinco (4mg/dm<sup>3</sup>), sulfato de manganês (3mg/dm<sup>3</sup>), ácido bórico (0,81 mg/dm<sup>3</sup>) e sulfato de cobre (1,5 mg/dm<sup>3</sup>) foi realizada mediante aplicação de solução. Os micronutrientes foram aplicados em 3 parcelas. A mesma adubação foi feita no segundo ciclo de estresse. Completado o período de aclimação as plantas foram submetidas a dois ciclos de estresse (dois períodos de encharcamento e seca) permitindo-se a recuperação após cada

um dos estresses. O experimento foi encerrado em Novembro de 2016 (primavera). A temperatura média diária da casa de vegetação ficou em torno de 22 °C, umidade relativa média 76 % e irradiância de 200  $\mu\text{mol}$  de fótons, durante todo o período experimental.

## **2.2- Imposição do estresse**

Após 60 dias de cultivo em casa de vegetação, foram realizadas as medições de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e coleta de folhas para análises bioquímicas (servindo como ponto de início dos experimentos). No primeiro dia após tais análises iniciais as mudas foram submetidas ao primeiro estresse, encharcamento. Para isso, um segundo vaso foi utilizado para cessar a drenagem proveniente do recipiente em que as mudas estavam inseridas. Nesse sentido, o interior desse segundo vaso foi revestido por um saco plástico e, assim, o vaso contendo a planta foi implantado sobre ele, permitindo a criação de um sistema saturado. Realizou-se a irrigação até saturação completa dos poros do substrato formando uma lâmina de água de aproximadamente 5 cm sobre o mesmo. Devido à evapotranspiração, a lâmina de água precisou ser repostada e isso levou à reoxigenação do sistema mesmo que em pequena proporção. As mudas foram mantidas por dez dias, tempo suficiente para se observarem nessa condição reduções em *A*, e no décimo primeiro dia o segundo vaso foi removido possibilitando a drenagem da água do sistema. Após a recuperação do encharcamento, obtida com base na recuperação da fotossíntese a níveis similares aos observados antes da imposição do estresse, submeteu-se as mesmas plantas ao segundo estresse, a seca. Desse modo, cessou-se a irrigação dos vasos até que as plantas atingissem potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) em torno de -2,00 MPa, potencial este onde foi possível observar sintomas visuais de deficiência hídrica, acompanhado pela medição na antemã (3:30 – 5:30 horas) com o auxílio de uma câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, USA). Após esse período, as mudas foram re-irrigadas e a recuperação acompanhada com base nos parâmetros de fotossíntese até alcançar níveis similares aos observados antes da imposição do estresse quando iniciou-se o segundo ciclo de estresse sendo novamente submetidos ao encharcamento (13 dias), recuperação, seca e recuperação realizada exatamente como descrito acima e conforme a figura a seguir:



**Figura 2-** Esquema envolvendo dois ciclos de encharcamento e déficit hídrico. As setas azuis indicam os pontos de coleta.

### 2.3- Análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Ao longo da imposição dos estresses o ciclo de estresse os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram mensurados a cada dois dias utilizando um sistema aberto com analisador de gases infravermelho (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) com fluorômetro acoplado (LI-COR Inc LI-6400-40, Lincoln, EUA) entre 8:00 e 12:00 h (horário local). Determinou-se a taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), razão entre a concentração interna e externa de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ), transpiração ( $E$ ), utilizando intensidade luminosa artificial de 1400  $\mu\text{mol}$  de fótons valor esse identificado previamente como o ponto onde a fotossíntese é máxima e 10 % de luz azul, concentração de  $CO_2$  em torno de 400 ppm, umidade entre 40-70 %, temperatura e vapor de água ambiente utilizando-se “buffer”. Para a determinação da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado o fluorômetro acoplado ao IRGA no mesmo momento de medição de  $A$  e respiração noturna ( $R_d$ ). Para tanto, a folha foi inicialmente submetido a um pulso de luz vermelho-distante (1-2  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para a determinação da fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, para a estimativa da fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ) foi aplicado um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e duração de 1 s. A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz ( $F_0'$ ) e a fluorescência máxima da clorofila ( $F_m'$ ) foram determinadas utilizando o mesmo equipamento simultaneamente a obtenção dos dados de trocas gasosas. A eficiência fotoquímica máxima do FSII ( $F_v/F_m$ ), do coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR) foram obtidos usando o mesmo equipamento. A respiração no escuro ( $R_d$ ) foi

mensurada 1h:30 min após o período de escuro (entre 21:00 e 01:00 h) utilizando-se o mesmo equipamento descrito acima. Para tais análises, foi utilizado o terceiro par de folhas completamente expandido entre o quinto e o sétimo ramo da haste principal.

#### **2.4- Coletas para análises bioquímicas**

As mesmas folhas utilizadas para as trocas gasosas e fluorescência (conforme descrito no tópico anterior) foram coletadas para os ensaios bioquímicos. As coletas para as análises foram realizadas: antes de iniciar o estresse, após dez dias de encharcamento, recuperação do encharcamento, déficit hídrico (até  $\Psi_w \sim -2,00$  MPa na antemanhã) e recuperação consecutiva nos dois ciclos. Nesse sentido, em cada época todo o material vegetal foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a  $-80$  °C para análises posteriores.

#### **2.5- Análises de pigmentos fotossintéticos e bioquímicas**

Alíquotas de aproximadamente 25 a 30 mg de massa fresca macerada em nitrogênio líquido e subsequentemente submetidas à extração metanólica, a quente segundo Lisec et al., 2006, com modificações. Assim, a microtubos de 2,0 mL contendo o material macerado foram adicionados 700  $\mu$ L de metanol 100 %. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 min a 70 °C sob agitação de 750 rpm. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 13500 rpm por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante (550  $\mu$ L) foi coletado e armazenado em um novo tubo de 2,0 mL acrescentando-se 375  $\mu$ L de clorofórmio e 750  $\mu$ L de água ultrapura. Entre cada adição o material foi novamente homogeneizado e após a adição de água, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C por 15 minutos. Em seguida, 1200  $\mu$ L da fase aquosa foram coletados e armazenados em um novo tubo de 1,5 mL.

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado conforme previamente descrito (Cross et al., 2006) utilizando-se o pellet remanescente do primeiro tubo após lavagem com metanol. A fração insolúvel em metanol foi ressuspensa em 400  $\mu$ L de NaOH 0,1 M e então homogeneizada com o auxílio de um vórtex. Os microtubos foram incubados por uma hora a 95 °C sob agitação de 400 rpm. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.300 rpm por 10 min. Uma alíquota de 5  $\mu$ L do sobrenadante foi então retirada dos microtubos, diluída 5 vezes em NaOH e adicionada a uma microplaca contendo 250  $\mu$ L de reagente Bradford (1x). A determinação do teor de

proteína foi mensurada através de uma curva de calibração contendo albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Os níveis de amido foram determinados segundo Fernie et al., 2001 com modificações, a partir do mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas. A fração insolúvel previamente ressuspensa em NaOH 0,1 M foi neutralizada com ácido acético 1M. A mistura para hidrólise do amido continha as enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades  $\mu\text{L}^{-1}$ ) e  $\alpha$ -amilase (0,01 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. A essa mistura (60  $\mu\text{L}$  do *mix* de hidrólise do amido) foram adicionadas 40  $\mu\text{L}$  de suspensão e incubada a 55 ° C durante 60 min em microplacas. Posteriormente, as placas foram centrifugadas durante 10 segundos e em seguida 15  $\mu\text{L}$  da suspensão foram transferidos para uma nova placa onde foi adicionado a cada poço 35  $\mu\text{L}$  de metanol e 160  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo tampão HEPES / KOH 1M, pH 7,0,  $\text{MgCl}_2$  (30 mM) , ATP (60 mg/mL), NADP (36 mg/mL) e glucose-6-fosfato desidrogenase (0,7 U/reacção). A determinação dos teores de glicose (amido hidrolisado) foi realizada com o uso de um leitor de microplacas, com leituras a 340 nm em intervalos de um minuto. Uma vez que as leituras estavam estáveis, iniciou-se a reacção adicionando hexoquinase (2 U/poço). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a seguinte equação:  $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$  e os resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de glicose por grama de massa seca ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  de MS).

Os aminoácidos totais foram mensurados como descrito por Cross et al., (2006). Para tanto, um *mix* contendo tampão citrato 1M, pH 5,2 com ácido ascórbico a 0,2 % (m/v), 25  $\mu\text{L}$  de extrato metanólico, 25  $\mu\text{L}$  de metanol e 100 mL de solução de ninhidrina a 1 % (m/v em etanol a 70 %) foi adicionada a uma microplaca que foi incubada no escuro durante 20 min a 95 ° C e após o resfriamento foi centrifugada por 15 segundos. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação do teor total de aminoácidos, foi realizada uma curva de calibração utilizando leucina como padrão. Os dados obtidos foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de MS.

Os níveis de glicose, frutose e sacarose foram determinados no extrato solúvel em metanol e água segundo metodologia descrita previamente (Fernie et al., 2001), com adaptações. Para tanto, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de extrato metanólico a uma mistura contendo tampão HEPES / KOH 0,1 M pH 7,  $\text{MgCl}_2$  (3 mM), ATP (60 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), NADP (36 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e glucose -6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (0,7U / reacção). As leituras cinéticas das absorvâncias foram realizadas a 340 nm, com intervalos de um minuto entre as leituras. Após a estabilização das absorvâncias, adicionou-se

hexoquinase (1,5 U / reação), fosfoglucoase isomerase (0,7 U / reação) e invertase (5U / reação) para determinar glicose, frutose e sacarose, respectivamente. Para calcular a concentração dos respectivos açúcares utilizou-se a seguinte equação  $\mu\text{mol NADPH} = \Delta\text{OD} / (2,85 * 6,22)$ .

Para quantificação dos pigmentos fotossintéticos, outra alíquota entre 20-30 mg foram pesadas e submetidas à extração etanólica a quente e a quantificação efetuada conforme descrito previamente por Wellburn, 1994.

## **2.6- Determinação da biomassa seca**

Ao término do experimento as plantas foram divididas em folha, caule, ramos e raiz. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas à estufa com circulação forçada de ar a 70°C e após atingir massa constante foi determinada a massa seca (MS).

## **2.7- Determinação da área foliar específica**

Para a determinação da área foliar específica (AFE), ao final de cada ciclo de seca foram coletados de quinze discos foliares ( $A=1,0297 \text{ cm}^2$ ) de cada planta, e levadas à estufa de circulação forçada de ar a 70°C até peso constante, aproximadamente 72h. A AFE foi realizada segundo (Hunt, 1982) empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{AFE (m}^2 \text{ Kg}^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos (m}^2\text{)}}{\text{massa seca dos discos (Kg)}}$$

## **2.8- Determinação do Teor Relativo de Água (TRA)**

O *status* hídrico também foi acompanhado pelo teor relativo de água (TRA). Assim, ao atingirem  $\Psi_w \sim -2,00 \text{ Mpa}$  foram coletadas aproximadamente quinze discos foliares ( $A=1,0297 \text{ cm}^2$ ) ao longo de toda a planta. Após essa retirada, os discos foram pesados para determinação da massa fresca (MF) sendo em seguida acondicionadas em placas de Petri contendo água destilada por um período de quatro horas. Posteriormente, o excesso de água dos discos foi retirado para obtenção da massa túrgida (MT). De posse dessa massa, os discos foram secos em estufa de circulação forçada de ar até obtenção da massa seca (MS). Uma vez obtido esses valores, o TRA foi mensurado segundo Cairo (1995), dado pela seguinte fórmula:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{\text{MF-MS} * 100}{\text{MT-MS}}$$

## **2.9- Taxa de crescimento relativo em altura**

Ao longo do experimento a altura foi mensurada com o auxílio de uma régua graduada desde a região basal (coletor) até a gema apical. A taxa de crescimento relativo em altura foi calculada de acordo com Hunt (1982).

## **2.10- Delineamento experimental**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se doze plantas de cada clone, sendo aleatoriamente divididos entre tratamentos (seis plantas) e controles (seis plantas) da seguinte forma: Clone Tolerante Controle (CTC), Clone Tolerante Tratamento (CTT), Clone Sensível Controle (CSC) e Clone sensível Tratamento (CST) perfazendo um total de vinte e quatro plantas. Foi adotado um esquema fatorial 2x2 (dois clones e dois regimes hídricos) em delineamento inteiramente casualizado contendo seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % ( $P < 0,05$ ).

## **3- RESULTADOS**

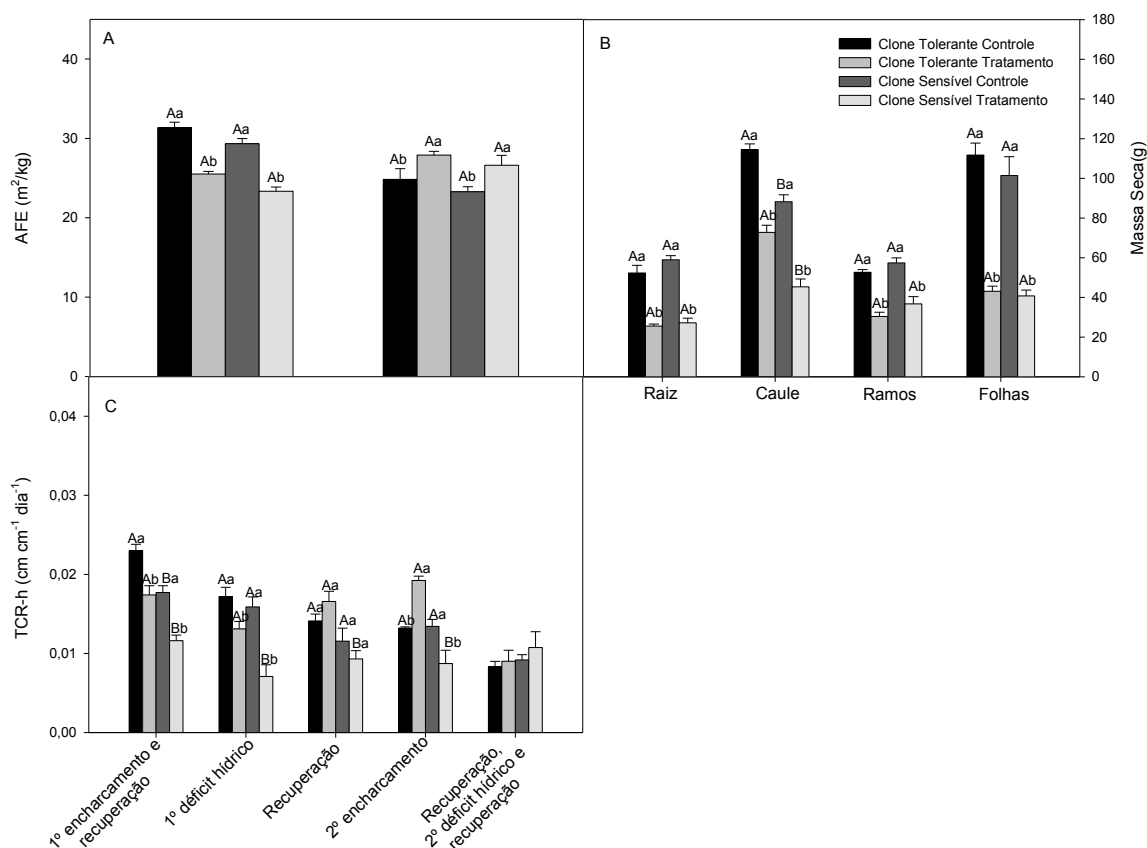
### **3.1- Área foliar específica (AFE), alocação de biomassa e taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h)**

Ao final de cada ciclo de seca determinou-se a AFE (Figura 1A) verificando-se que durante a primeira fase houve uma redução na AFE ao passo que ao final da segunda fase de seca foi observado um incremento nos clones cultivados sob tratamento em relação aos controles.

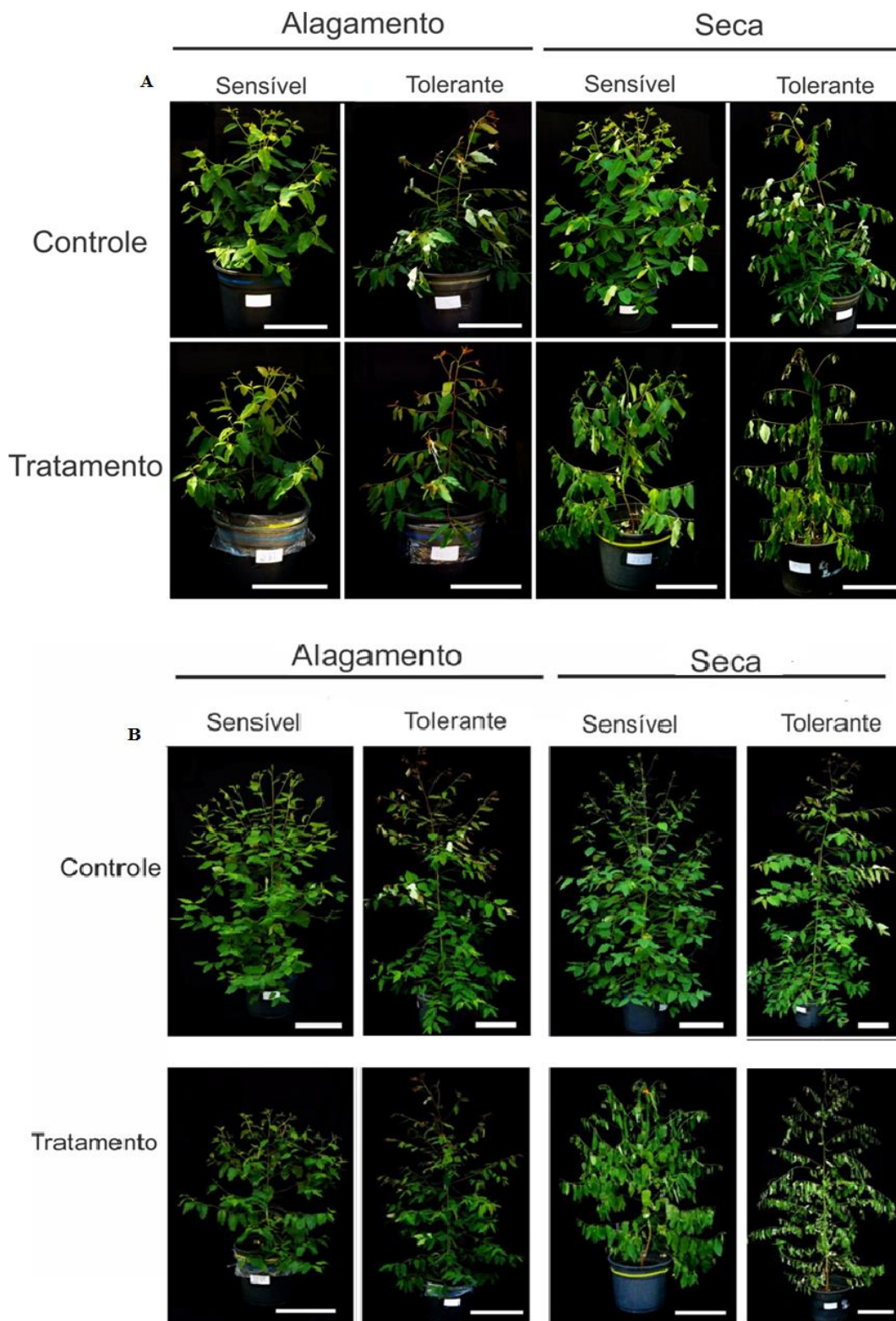
A alocação da biomassa nos diferentes órgãos foi reduzida tanto no CTT quanto no CST indicando que ciclos consecutivos de estresse comprometem o desenvolvimento de eucalipto (Figura 2). Assim, a massa seca de raiz (MS Raiz-Figura 1B), massa seca dos ramos (MS Ramos-Figura 1B) e massa seca foliar (MSF-Figura 1B) foram diminuídos nas plantas sob tratamentos em relação aos controles, no entanto, não diferiu entre os clones. De modo particular, a massa seca do caule (MSC) (Figura 1B) foi também reduzida nos tratamentos, porém o CTT apresentou maiores incrementos comparados ao CST. Ressalta-se aqui que, após os dois ciclos de seca, houve queda de folhas associada também ao aparecimento de sintomas associados à seca de ponteiros como murcha, encarquilhamento e a seca do ponteiro propriamente dita (Figura 3). Cabe mencionar também que, após o primeiro ciclo de estresses, observou-se o surgimento de sintomas

associados à seca de ponteiros em apenas uma planta do clone tolerante. Em adição, ao final do segundo ciclo, em que as plantas apresentavam maior altura, sintomas usualmente observados em plantas apresentando seca de ponteiros foram observados em cinco plantas do clone sensível e em apenas duas plantas do clone tolerante.

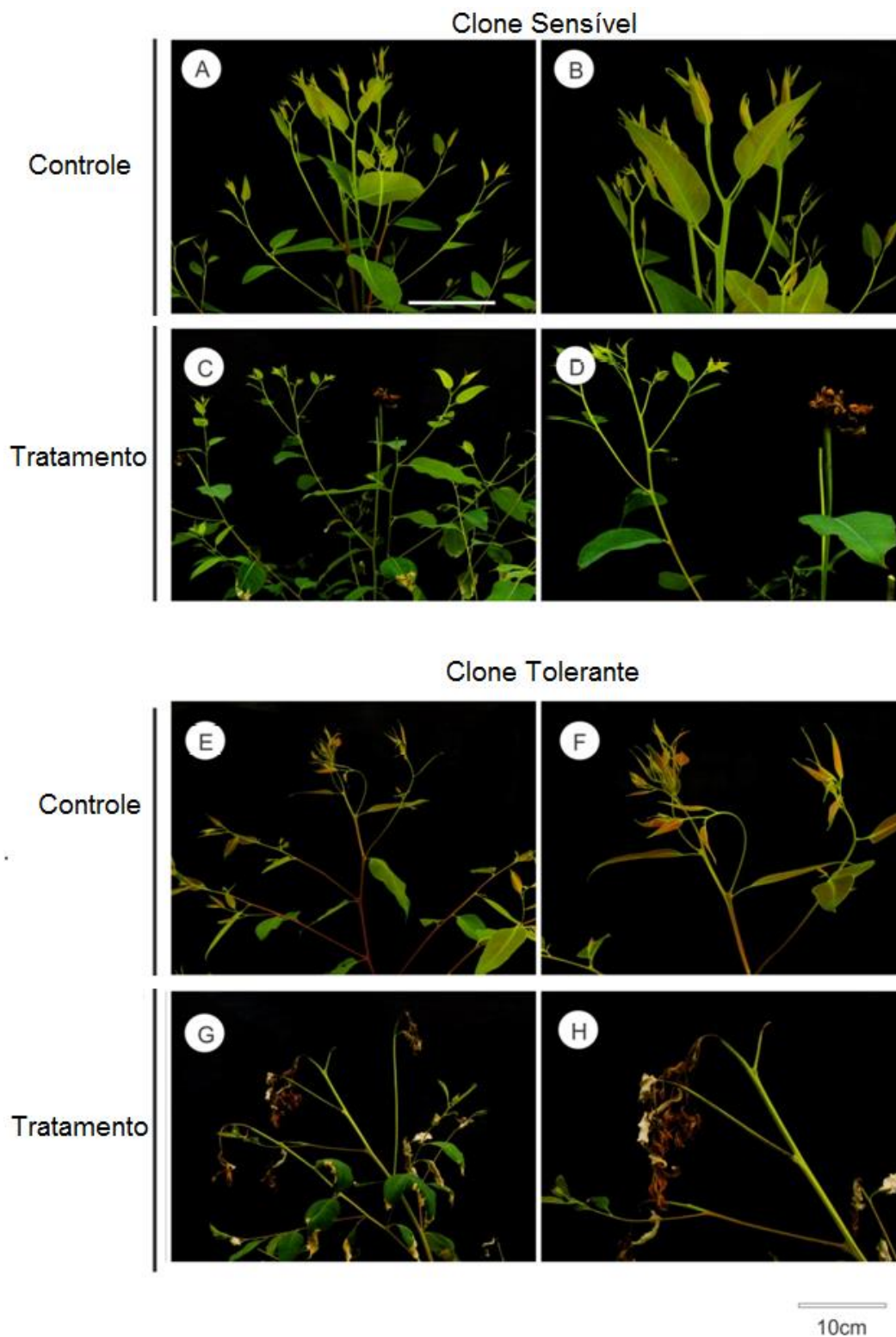
Após o primeiro encharcamento e primeira seca a TCR-h (Figura 1C) foi menor em ambos os clones submetidos aos tratamentos sendo, ainda menor, no CST. Após a segunda exposição ao excesso hídrico incrementos no CTT puderam ser notados enquanto reduções foram notadas no CST.



**Figura 1-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico na área foliar específica (A), matéria seca de raiz, caule, ramos e folhas (B) e taxa de crescimento relativo em altura (C) em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam médias  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.



**Figura 2-** Impactos do segundo ciclo de encharcamento e déficit hídrico no desenvolvimento de dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Plantas com 118 dias após o transplante (encharcamento) e plantas com 140 e 142 dias após o transplante (déficit hídrico) dos clones tolerante e sensível, respectivamente. Primeiro ciclo de estresse (A) e segundo ciclo de estresse (B).

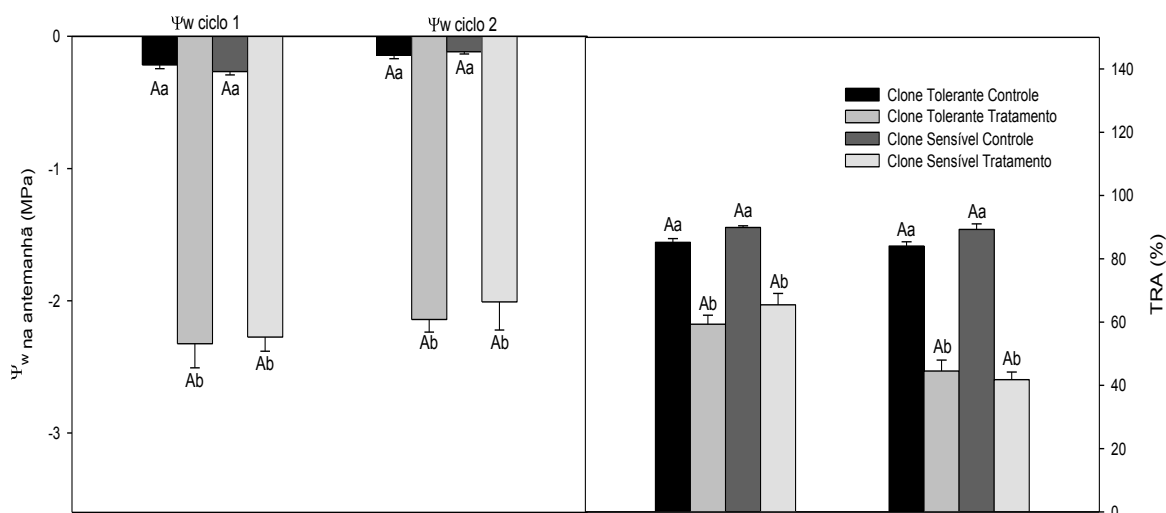


**Figura 3-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico no aparecimento da seca de ponteiros em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD após ciclos consecutivos de estresse. Controle clone sensível (A-B); tratamento clone sensível (C-D), controle clone tolerante (E-F) e tratamento clone tolerante (G-H).

### 3.2- Teor relativo de água (TRA) e potencial hídrico ( $\Psi_w$ )

Ao longo dos dois períodos de déficit hídrico o  $\Psi_w$  na antemanhã foi acompanhado (Figura 4A) e quando os clones atingiram  $\Psi_w \sim -2,00$  MPa discos foliares foram coletados e o TRA foi determinado (Figura 4B). O CTT reduziu mais rapidamente o

status hídrico durante os dois ciclos e de modo que no primeiro ciclo a diferença entre o CTT e CST foi de quatro dias ao passo que no segundo ciclo foi de dois dias. Embora quedas nos valores de TRA para tratamentos em relação ao controle tenham sido observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos não foram observadas nos dois ciclos.



**Figura 4-** Impactos de ciclos de encharcamento e déficit hídrico no potencial hídrico foliar e teor relativo de água em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Potencial hídrico foliar (A) e teor relativo de água (B). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam médias  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

### 3.3- Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

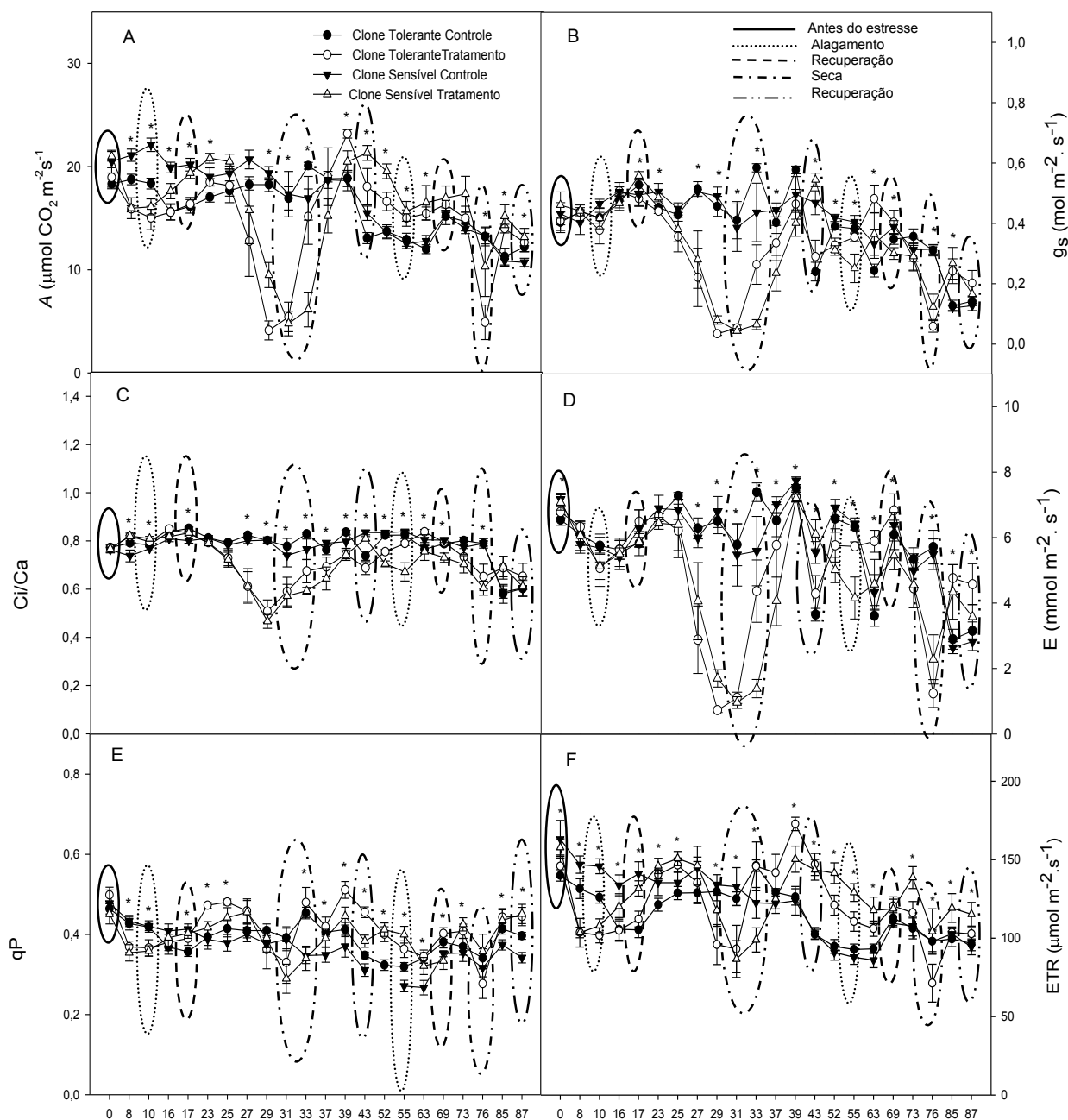
Antes de as plantas serem submetidas ao primeiro ciclo de estresse (excesso de água) não se observaram diferenças na taxa fotossintética ( $A$ ) (Figura 5A), condutância estomática ( $g_s$ ) (Figura 5B), razão entre a concentração de carbono interno e ambiente ( $C_i/C_a$ ) (Figura 5C), transpiração ( $E$ ) (Figura 5D), *quenching* fotoquímico ( $qP$ ) (Figura 5E), taxa de transporte de elétrons (ETR) (Figura 5F), respiração noturna ( $R_d$ ) (Figura 6A) e rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) (Figura 6B) entre os tratamentos e os controles. De modo resumido, os clones aqui utilizados apresentam, na ausência de estresse, parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* similares.

Durante o encharcamento foi possível observar, a partir do oitavo dia, reduções em  $A$  sem alterações em  $g_s$  em ambos os clones (Figura 5A e 5B). No entanto, após a remoção do excesso de água ambos os clones retomaram seus valores próximos ao controle não se observando mais diferenças. Com o decorrer da deficiência hídrica verificou-se que o CTT apresentou quedas em  $A$  mais rapidamente que o CST e, assim,

uma diferença de quatro dias entre eles até atingir  $\Psi_w \sim -2,00$  Mpa foi observada. Essas diferenças não mais existiram dois dias após a retomada da irrigação e, de modo interessante, maiores  $A$  foram observados para os tratamentos em relação aos controles ao final desse primeiro período de recuperação da primeira deficiência hídrica. Ao final do segundo ciclo de encharcamento o CTT não diferiu em relação ao CTC, no entanto o CST obteve maiores valores quando comparado a seu controle. De todo modo, sete dias após a drenagem ambos os clones sob tratamento apresentaram maiores  $A$  que os respectivos controles, embora esse efeito tenha sido minimizado depois de quatorze dias. De modo similar ao observado no primeiro ciclo, o CTT apresentou reduções na taxa fotossintética de modo mais rápido. O *status* hídrico foi determinado e a diferença entre os tratamentos teve duração de dois dias. Após a reidratação do solo, houve recuperação em  $A$  para todos os tratamentos.

O primeiro ciclo de encharcamento do solo não promoveu reduções em  $g_s$  (Figura 5B) indicando que as reduções observadas em  $A$  estariam mais relacionadas a limitações não-difusivas. Por outro lado, a deficiência hídrica promoveu diminuições em  $g_s$  desde o décimo dia de tratamento até o último dia nessa condição, efeito esse revertido com a retomada da irrigação. Durante o segundo ciclo de estresse verificou-se um declínio para ambos os clones no que respeita os valores de  $g_s$  com nove dias de encharcamento; entretanto, com doze dias de excesso hídrico tais reduções foram mantidas somente para o CST. Com a drenagem, foi notada a recuperação em  $g_s$  alcançando, pois, valores mais próximos aos respectivos controles. Adicionalmente, o déficit hídrico promoveu diminuições em  $g_s$ , efeito esse não mais evidente com a posterior reidratação.

A razão  $C_i/C_a$  após dez dias de excesso hídrico sofreu incrementos apenas no CST sugerindo que as reduções observadas em  $A$  possam estar associadas a limitações bioquímicas (Figura 5C). A remoção do excedente de água promoveu a recuperação desse parâmetro. Sob seca, diminuições em  $C_i/C_a$  foram verificadas em ambos os clones a partir do décimo dia assim como em  $g_s$  indicando um possível comprometimento difusivo. Com a retomada da reirrigação essas diferenças foram minimizadas, embora



**Figura 5-** Impactos de ciclos de encharcamento e seca nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial à SPEVRD. Taxa fotossintética (A); condutância estomática (B); razão  $C_i/C_a$  (C); transpiração (D); *quenching* fotoquímico (E) e taxa de transporte de elétrons, ETR (F). Os asteriscos indicam os pontos onde foi observada diferença entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

ainda sejam evidenciadas ligeiras diminuições em  $C_i/C_a$  para o CTT após doze dias. Durante o segundo ciclo, o encharcamento promoveu reduções em  $C_i/C_a$  para ambos os tratamentos com nove dias e é importante ressaltar que com doze dias essas diminuições foram mantidas apenas para o CST. Após o último dia de avaliação durante a recuperação pequenas reduções em  $C_i/C_a$  para o CST ainda foram observadas. A

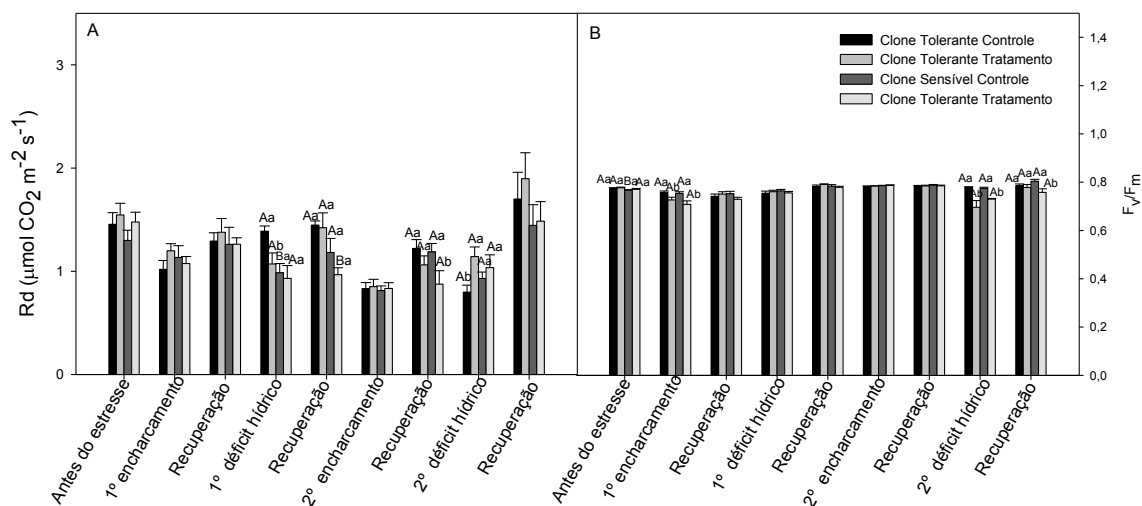
deficiência hídrica também ocasionou diminuições nesse parâmetro, porém uma total recuperação em  $C_i/C_a$ , para ambos os clones, foi notada com a reidratação (Figura 5C).

A  $E$  não sofreu alterações em plantas submetidas ao primeiro evento de encharcamento (Figura 5D). No entanto, ao final do primeiro ciclo de seca evidenciaram reduções em  $E$  para ambos os clones. Durante o segundo ciclo de estresse, foi possível verificar que o excesso hídrico levou a decréscimos em  $E$  apenas no CST ao passo que tal decréscimo foi recuperado com a retirada do excesso hídrico. Novamente, durante a seca, reduções em  $E$  foram observadas para ambos os clones submetidos ao tratamento. Ressalte-se aqui que a reirrigação garantiu a recuperação dos tratamentos no que respeita  $E$  e que no último dia de avaliação o CTT apresentou maiores valores em relação ao controle (Figura 5D).

O  $qP$ , que se refere à utilização da energia proveniente da luz na etapa fotoquímica da fotossíntese, foi reduzido em ambos os clones durante o encharcamento sendo, todavia, recuperado posteriormente após a drenagem (Figura 5E). No decorrer da primeira deficiência hídrica não se notaram alterações em  $qP$  indicando que as reduções em  $A$  estariam associadas mais fortemente a aspectos difusivos. Com a imposição do segundo ciclo de estresse evidenciou-se que o encharcamento promoveu incrementos em  $qP$  em ambos os tratamentos após nove dias; porém, ao final da avaliação (doze dias) esses acréscimos somente foram observados no CST. O segundo ciclo de déficit hídrico não mais alterou o  $qP$ .

A ETR foi reduzida durante o primeiro encharcamento nas plantas submetidas aos tratamentos; contudo, após a retirada do excesso de água houve a recuperação desse parâmetro (Figura 5F). No último dia de avaliação durante a deficiência hídrica os tratamentos não diferiram em relação aos controles no que se refere à ETR, embora pequenas e não consistentes, variações tenham sido notadas em dias anteriores (Figura 5F). Com a reirrigação, os tratamentos apresentaram valores superiores aos controles. Ao se iniciar o segundo ciclo de estresse, pôde-se notar que ambos os tratamentos apresentaram incrementos em ETR em relação aos controles, o que justificaria, ao menos em parte, a manutenção de  $A$  nessa condição. Todavia, a imposição da seca não promoveu alterações em ETR sendo os valores mantidos próximos aos controles.

Durante a primeira deficiência hídrica reduções em  $R_d$  foram observadas para o CTT sendo posteriormente recuperadas após a retomada da rega (Figura 6A). Ao serem submetidas ao segundo ciclo de estresse, não se notaram alterações em  $R_d$  durante o encharcamento; porém, na recuperação evidenciaram-se reduções no CST em relação ao



**Figura 6-** Impactos de ciclos de encharcamento e seca nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Respiração noturna (A) e rendimento quântico do PSII,  $F_v/F_m$  (B). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

controle. De modo interessante, durante o segundo ciclo de seca foi observado um aumento em  $R_d$  no CTT em comparação ao CTC e a recuperação desse parâmetro ocorreu com a reidratação (Figura 6A).

Plantas sob condições de encharcamento sofreram reduções em  $F_v/F_m$  quando comparadas aos respectivos controles indicando, assim, um comprometimento do PSII; não obstante, a recuperação ocorreu com a drenagem do solo (Figura 6B). Registre-se também que durante o segundo ciclo de estresses alterações similares foram observadas durante a deficiência hídrica tanto no CTT quanto CST, sendo tais reduções ainda notadas na fase de recuperação somente para o CST (Figura 6B).

### 3.4- Teores de clorofilas, açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis totais e aminoácidos totais

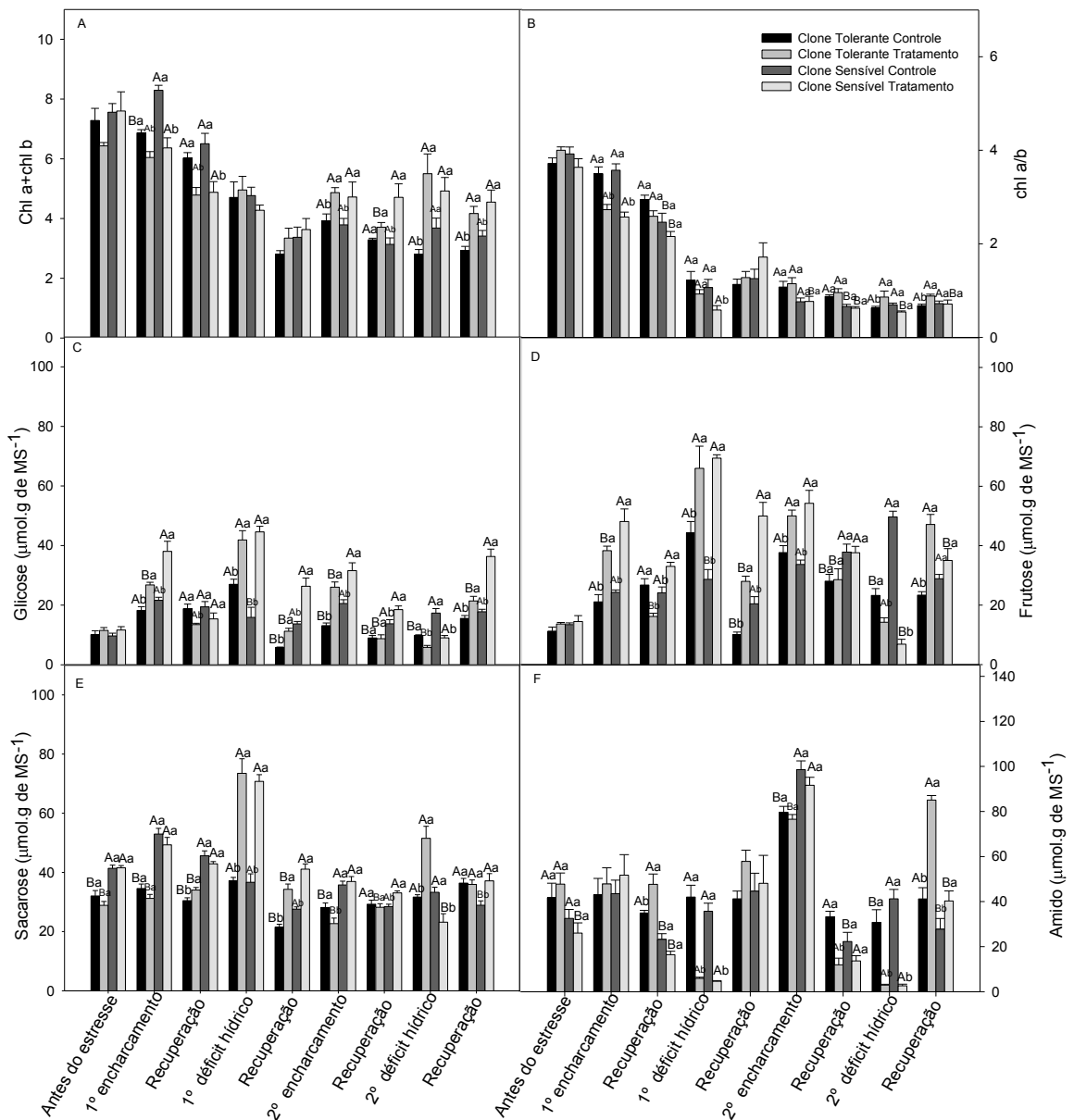
Em função das alterações observadas nos parâmetros de trocas gasosas em resposta às condições de estresse (Figuras 5 e 6) buscou-se compreender melhor tais variações mediante análises dos níveis de clorofilas e de alguns metabólitos. Assim, verificou-se reduções nos níveis de clorofilas totais em plantas de ambos os tratamentos submetidas ao primeiro encharcamento sendo mantidos níveis baixos durante a recuperação (Figura 7A). Entretanto, a primeira deficiência hídrica não promoveu alterações nos níveis de clorofilas totais das plantas em ambos os tratamentos. De modo interessante, o segundo encharcamento levou a incrementos nos níveis de clorofilas totais tanto em CTT quanto

em CST persistindo durante a seca e também na recuperação o que explica, ao menos parcialmente, a manutenção da taxa fotossintética ao longo do segundo ciclo de estresse (Figura 7A).

A razão chl *a/b* (Figura 7B) foi reduzida em ambos os clones submetidos ao encharcamento sendo recuperada após a drenagem. Na primeira seca diminuições foram observadas apenas no CST. Modificações entre os tratamentos durante o segundo ciclo de estresse foram notadas durante a deficiência hídrica em que plantas do CTT apresentaram incrementos em comparação ao controle (Figura 7B).

Ao se avaliar o metabolismo do carbono foi possível observar que incrementos nos níveis de glicose (Figura 7C) e frutose (Figura 7D) durante o primeiro encharcamento em ambos os tratamentos sem alterações nos níveis de sacarose (Figura 7E). Após a drenagem houve declínios em glicose e frutose apenas para o CTT. De modo geral, a deficiência hídrica promoveu aumentos em glicose, frutose e sacarose em ambos os clones e, durante a recuperação, embora tenham sido notadas reduções os conteúdos observados nos clones sujeitos aos estresses ainda se mantiveram elevados em relação aos respectivos controles (Figuras 7C, 7D e 7E). De modo similar ao observado durante o primeiro encharcamento, ao passarem pela segunda vez por esse mesmo tratamento, incrementos em glicose e frutose foram observados em todos os tratamentos ao passo que reduções nos níveis de sacarose foram observadas para o CTT. Curiosamente, o segundo ciclo de seca provocou diminuições em glicose e frutose tanto em CTT quanto em CST; entretanto, a manutenção de maiores níveis de sacarose foi evidenciada apenas para o CTT. Após a retomada da irrigação os tratamentos recuperaram os níveis de açúcares solúveis sendo evidenciados incrementos em glicose para ambos os tratamentos, frutose para o CTT e sacarose para o CST em relação aos seus respectivos controles (Figuras 7C, 7D e 7E).

Os níveis de amido (Figura 7F) não foram alterados durante o primeiro encharcamento, embora uma tendência de aumentos para as plantas cultivadas sob os tratamentos tenha sido observada. No entanto, com a recuperação, o CTT apresentou maiores valores em relação ao CTC e CST. A deficiência hídrica promoveu quedas nos níveis de amido em ambos os clones sob tratamento. Durante a recuperação do segundo encharcamento reduções nos níveis de amido para o CTT foram observadas. Cabe ressaltar também que ao final do segundo ciclo de déficit hídrico foram novamente observadas reduções desse metabólito em ambos os clones que, posteriormente,



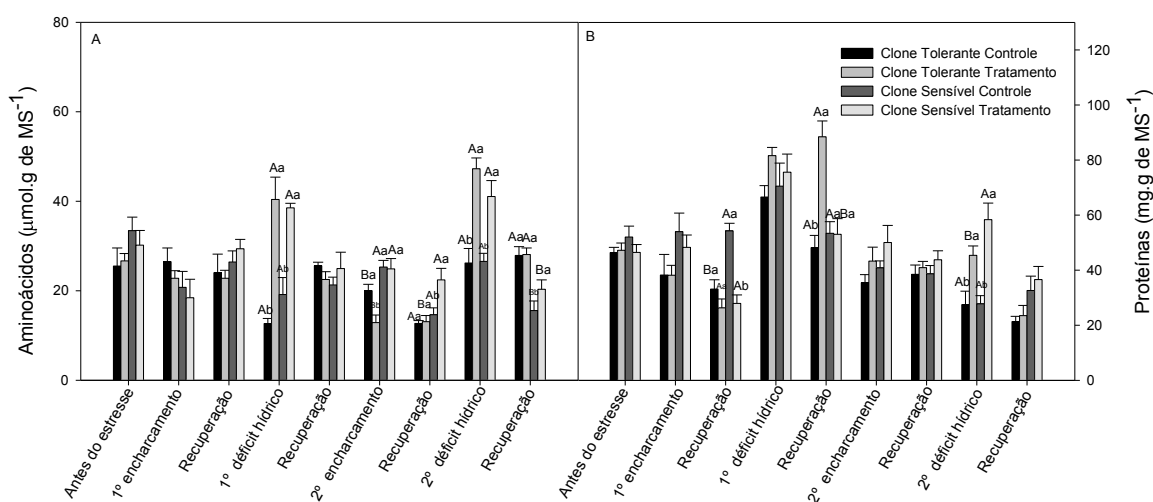
**Figura 7-** Impactos de ciclos de encharcamento e seca nos teores de clorofilas, açúcares solúveis e amido em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Clorofilas totais (A), razão chl *a/b* (B), glicose (C), frutose (D), sacarose (E) e amido (F). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições e  $n =$  quatro repetições para o amido.

retornam a valores similares aos observadas em plantas controles com a reirrigação (Figura 7F).

Observa-se que o primeiro ciclo de seca promoveu incrementos nos níveis de aminoácidos totais (Figura 8A) em ambos os clones sob tratamento, notando-se também uma recuperação *a posteriori*. Durante a imposição do segundo ciclo foi visto que o encharcamento promoveu reduções para o CTT com recuperação após a drenagem.

Assim como durante a primeira seca, a segunda exposição também ocasionou incremento nos teores de aminoácidos (Figura 9A).

O conteúdo de proteínas totais (Figura 8B) não alterou durante a primeira deficiência hídrica; todavia, após a drenagem houve um incremento considerável no CTT. De modo interessante, o segundo déficit hídrico promoveu incrementos nos níveis desse metabólito (Figura 9B).



**Figura 8-** Impactos de ciclos de encharcamento e seca nos teores de aminoácidos solúveis totais e proteínas em dois clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD. Aminoácidos totais (A) e proteínas totais (B). Letras maiúsculas denotam diferenças entre os clones para o mesmo tratamento enquanto que letras minúsculas denotam diferenças entre os tratamentos para o mesmo clone. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5 % de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) com  $n =$  seis repetições.

#### 4- DISCUSSÃO

Este trabalho é o primeiro a explorar os impactos de ciclos sucessivos de encharcamento-drenagem-seca e recuperação em clones de eucalipto com tolerância diferencial a SPEVRD e quais os fatores estariam mais fortemente relacionados aos sintomas comumente associados a essa anomalia. Assim, a primeira exposição das plantas ao encharcamento promoveu reduções em  $A$ ,  $qP$ ,  $ETR$  e  $F_v/F_m$  em ambos os clones submetidos a esse estresse concomitantemente a quedas na razão  $C_i/C_a$  somente para o CST (Figura 5). Tomados em conjunto, esses resultados indicam um possível comprometimento do aparato fotossintético, uma vez que quedas em  $A$  estariam mais relacionadas à etapa fotoquímica da fotossíntese do que a limitações difusivas. Em paralelo, reduções nos teores de clorofilas totais e também na razão chl  $a/b$  foram observadas (Figuras 7A e 7B). Em trigo, o excesso de água também afetou o aparato

fotossintético verificando-se uma redução em  $F_v/F_m$ ,  $qP$  e concomitantes quedas em  $A$  (Tan *et al.*, 2008). Coletivamente, tais resultados associados aos aqui observados sugerem que possíveis danos ao PSII estejam associados a uma maior degradação de clorofila culminando em reduções em  $A$  sem, no entanto, promover sintomas associados a SPEVRD após a exposição a um estresse isolado.

De modo interessante, a segunda exposição ao excesso hídrico foi associada a incrementos em  $A$  após nove dias de estresse nos clones sob estresse em relação aos controles. Não obstante, ao final da avaliação (doze dias de encharcamento), esses aumentos foram notados somente no CST ao passo que o CTT não diferiu significativamente em relação ao controle (Figura 5A). Sob encharcamento, a manutenção de  $A$  foi acompanhada pela conservação de  $g_s$ ,  $C_i/C_a$ ,  $E$ ,  $qP$  simultaneamente a aumentos em ETR no CTT, indicando que uma pré-exposição ao estresse, de certa forma, melhorou o desempenho fotossintético dessas plantas (Figura 5). Adicionalmente, a imposição ao segundo ciclo de encharcamento no CST foi associada a incrementos em  $A$ , embora reduções em  $g_s$ ,  $C_i/C_a$  e  $E$  acompanhados de aumentos em  $qP$  e ETR tenham sido observados (Figuras 5). Plantas de trigo que passaram por eventos de alagamento antes e após a antese apresentaram declínios em  $A$  acompanhados por quedas em  $g_s$  e também nos valores de SPAD; no entanto, tais reduções ocorreram em menor intensidade quando comparado às plantas que foram alagadas somente após a antese (Li *et al.*, 2011) indicando uma considerável melhora no desempenho fotossintético naquelas plantas que já haviam passado por tal situação.

Embora o encharcamento inicial tenha promovido reduções nos teores de clorofilas totais e também na razão chl  $a/b$  a exposição posterior a esse estresse não promoveu modificações na razão chl  $a/b$  a despeito dos incrementos no teor de clorofilas totais em ambos os clones submetidos aos tratamentos (Figura 7A e 7B). Tais resultados estão em consonância com as alterações observadas nos parâmetros de trocas gasosas, em que em um primeiro momento houve um comprometimento do aparato fotossintético com alguns declínios e posteriormente tais danos não foram mais observados. Nesse contexto, é plausível sugerir que plantas previamente exposta a um certo fator estressante podem desenvolver uma aclimação diferencial, também chamada de “memória ao estresse”, que poderia eventualmente potencializar as respostas de defesa a exposição subsequente ao mesmo estresse (Bruce *et al.*, 2007; Iwasaki & Paszkowski, 2014; Fleta-Soriano & Munné-Bosch, 2016). Assim, evidências demonstrando aclimação diferencial a uma gama de estresses incluindo frio (Byun *et al.*, 2014), altas temperaturas (Hu *et al.*, 2015), salinidade (Hu *et al.*, 2016) e seca (Ding *et al.*, 2012) têm

sido observadas. Não obstante, os resultados aqui apresentados evidenciam que plantas de eucalipto sujeitas a múltiplos eventos de estresse são capazes de lidar melhor com o encharcamento que aquelas submetidas a esse estresse pela primeira vez.

Os níveis de glicose e frutose ao final do primeiro e segundo ciclo de encharcamento apresentaram-se maiores em relação ao controle (Figura 7C e 7D). O teor de sacarose, todavia, não diferiu no primeiro encharcamento; no entanto, ao serem submetidos à condição de encharcamento pela segunda vez, observam-se pequenas reduções no CTT, o que poderia estar associado a uma maior degradação possibilitando à manutenção de outras vias para produção de energia (Figura 7E). De modo similar, em *Quercus robur* e *Fagus sylvatica* aumentos em glicose e frutose foram mais pronunciados enquanto a sacarose não foi alterada (Ferner et al., 2012). Ademais, o conteúdo de amido não apresentou alterações evidentes durante os dois eventos de encharcamento indicando que reduções observadas em *A* no primeiro evento estariam relacionadas a uma limitação fotoquímica embora tendências de aumentos nos tratamentos tenham sido verificadas (Figura 7F). Sob condições de alagamento ou inundação observa-se acúmulo de amido em folhas de girassol (*Helianthus annuus L.*) (Wample & Davis, 1983) e maçã (*Syzygium samarangense Merr. Et Perry*) (Hsu, 1999) e, em algumas situações, esse acúmulo parece estar associado à reduções em *A* como em *Distylium chinense* (Liu et al., 2014).

Os resultados das duas exposições a eventos de encharcamento demonstram uma adequada plasticidade desses materiais mediante exposições consecutivas, uma vez que a exposição posterior levou a respostas que puderam conferir uma maior vantagem para essas plantas como, por exemplo, a manutenção de  $g_s$  no caso do CTT. Tomados em conjunto, esses resultados fornecem evidência adicionais que as plantas sujeitas a eventos recorrentes de estresse, como comumente observado em condições de campo, são capazes de não somente incrementar sua capacidade de fixação de carbono, mas também de, possivelmente, ajustar seus mecanismos de defesa contra os efeitos prejudiciais do encharcamento quando comparadas aquelas plantas que sofreram um evento único. Com efeito, pouco ou nada se sabe acerca dos mecanismos de proteção encontrados em eucalipto em resposta ao encharcamento e assim, estudos futuros devem buscar investigar melhor como tais plantas respondem a esse estresse haja vista a importância dessa espécie mundialmente e a ocorrência recorrente de eventos de encharcamento em todo o mundo. Nesse sentido, as alterações metabólicas observadas em resposta aos ciclos de estresse e recuperação em eucalipto, associadas a recentes estudos com plantas de arroz sujeitas a ciclos de estresse por sal (Hu et al., 2016)

representam os primeiros trabalhos a estudar a memória ao estresse em uma perspectiva metabólica.

Com o avanço da deficiência hídrica, a manutenção do *status* hídrico vegetal torna-se um processo energeticamente dispendioso estando fortemente associado a quedas em  $g_s$  e, conseqüentemente, reduções em  $A$  (Mitchell et al., 2014). De fato, a primeira deficiência hídrica provocou alterações em  $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i/C_a$  e  $E$  no CTT e CST sem, contudo, alterar  $qP$ ,  $ETR$  e  $F_v/F_m$  (Figura 5 e 6). Esses resultados indicam possíveis limitações difusivas ao processo fotossintético ocorrendo em ambos os clones em resposta a imposição de um ciclo de encharcamento e secagem. Plantas do CTT apresentaram respostas mais rápidas associadas a esses parâmetros e que também as flutuações observadas para esse clone no que se refere ao seu  $\Psi_w$  perfazendo, ao final, uma diferença de quatro dias entre os clones além das reduções verificadas em  $R_d$ . É importante mencionar também que em seringueira (*Hevea brasiliensis*), diminuições em  $A$  parecem estar mais fortemente associadas ao fechamento estomático (Chen et al., 2010).

Como previamente mencionado, a última mensuração das trocas gasosas durante o último período de seca (segundo ciclo), foi realizada um e três dias antes das plantas atingirem o potencial hídrico desejado no CTT e CST, respectivamente. Novamente, o CTT apresentou uma resposta mais precoce, no entanto, a diferença ora observada foi de apenas dois dias. Essa última medição demonstrou que  $g_s$ ,  $C_i/C_a$ ,  $E$  e  $F_v/F_m$  foram reduzidos em ambos os clones, destacando-se alterações nesse último parâmetro, que indicam possíveis danos ao PSII. Em consonância, gramíneas (*Arrhenatherum elatius*) sujeitas a ciclos recorrentes de seca foram também caracterizadas por reduções em  $F_v/F_m$  (Walter et al., 2011). Ao se considerar a fotossíntese como um dos processos que melhor caracteriza o *status* de uma planta os resultados aqui obtidos indicam que plantas sujeitas a múltiplos eventos de estresse foram capazes de se aclimatar a tais episódios mediante melhoras na sua performance fotossintética (Figura 5). Embora poucos estudos tenham mostrado incrementos no acúmulo de biomassa (Walter et al., 2013) e na manutenção de um *status* hídrico mais adequado (Ding et al., 2012) em outras espécies submetidas a ciclos de deficiência hídrica estudos investigando os impactos desses múltiplos ciclos nas trocas gasosas são ainda relativamente escassos. Reforçam-se aqui os resultados apresentados no Capítulo I, na medida em que clones de eucalipto parecem mostrar uma alta capacidade de se aclimatar a eventos múltiplos de estresse.

Reduções em  $A$  acopladas com aumentos em  $R_d$  no CTT em resposta aos ciclos múltiplos de estresse (Figuras 5A e 6A) indicam possíveis modificações e/ou ajustes para manutenção do metabolismo energético. Cumpre mencionar que um modelo bifásico da respiração frente a reduções no TRA já foi previamente descrito (Flexas et al., 2005), demonstrando que, em um primeiro momento, a respiração é substancialmente diminuída em resposta a um menor crescimento; porém, com o avanço da seca incrementos na respiração são comumente observados provavelmente devido a uma maior demanda metabólica e energética. Esse efeito pode explicar, pelo menos em parte, as flutuações observadas nos níveis dos açúcares e amido nas folhas (Figuras 7C, 7D, 7E e 7F). Na primeira exposição à seca, os açúcares solúveis totais aumentaram em ambos os clones (Figuras 7C, 7D e 7E) e, em paralelo, diminuições nos níveis de amido (Figura 7F) bem como da taxa de crescimento foram observadas, efeito esse maior no CST (Figura 1C). A exposição posterior à seca ocasionou diminuições tanto em glicose quanto em frutose sendo os efeitos mais pronunciados nos CTT e CST indicando uma manutenção de outras vias como forma de sustentar a produção energia. Nesse contexto, foi observado em espécies como girassol e sorgo que a deficiência hídrica levou a aumentos nos açúcares solúveis e quedas nos níveis de amido em girassol (Turner et al., 1978). De toda sorte, uma resposta diferencial no segundo ciclo foi verificada em que pese o CTT parecer apresentar maiores vantagens, muito provavelmente associadas a um mecanismo de antecipação da resposta aos estresses.

Durante a deficiência hídrica aumentos pronunciados nos níveis de aminoácidos totais foram observados para ambos os clones sendo notados ainda incrementos em proteínas totais apenas ao final do segundo déficit hídrico, indicando uma manutenção da síntese proteica (Figuras 8A e 8B). O maior acúmulo de diversos aminoácidos pode estar relacionado a um desarranjo nos parâmetros fotossintéticos e também na sustentação da atividade mitocondrial (Lawlor & Cornic, 2002). A importância de aminoácidos, particularmente os de cadeia ramificada, foi recente associado à tolerância a limitação hídrica em *Arabidopsis thaliana* (Pires et al., 2016) e assim, incrementos na concentração desses aminoácidos parece estar associado ao seu uso como substrato respiratório (Araújo et al., 2011; Hildebrandt et al., 2015). Ademais, os resultados obtidos com açúcares, em geral, e aminoácidos totais em combinação com os resultados de trocas gasosas sugerem que processos fisiológicos chaves, tais como a respiração e a fotorrespiração, em adição à fotossíntese *per se*, estejam envolvidos no processo de memorização e aclimatação a eventos recorrentes de estresses, como aqui simulados.

A retomada da irrigação após os dois eventos de déficit hídrico promoveu a recuperação, quase completa, da maioria dos parâmetros de trocas gasosas bem como dos metabólitos aqui analisados (Figuras 5, 6, 7 e 8). Essa fase de recuperação apresenta importante impacto no que se refere ao modo como a produtividade de plantas se comportará mediante eventos de deficiência hídrica e a subsequente reidratação (Martorell et al., 2014). Nesse contexto, as observações verificadas a nível de fisiologia e metabolismo são consistentes com uma recuperação parcial em plantas de eucalipto submetidos a apenas um ciclo e que, a completa recuperação, seja provavelmente dependente do número de eventos estressantes pelos quais a planta é submetida ao longo do seu ciclo de vida. Em relação à alocação da biomassa vale destacar que embora a MSC tenha sido reduzida, ela foi ainda menor no CST em comparação ao CTT indicando que esse último mesmo sob condições de estresse apresentou maior aporte de carbono no caule, o que seria vantajoso do ponto de vista produtivo. É importante mencionar também que a maioria da informação adquirida em termos de tolerância a estresse tem sido obtida em plantas submetidas a um fator estressante considerado de modo individual e que aconteceria apenas uma vez durante o ciclo de vida vegetal, em contraste como que usualmente acontece em condições naturais em que eventos recorrentes de deficiência hídrica, associados a outros estresses (e.g., temperatura, irradiância, excesso de água, etc), ocorrendo a níveis e por períodos de tempo distintos (Gallé et al., 2011).

Nesse trabalho foi possível verificar, pela primeira vez, a ocorrência de sintomas associados à seca de ponteiros como, murcha, encarquilhamento e a morte do meristema apical (Figura 9). Embora após o primeiro ciclo de estresse (encharcamento e seca) apenas uma planta do CTT apresentou tais sintomas, foi possível observar que, após o segundo ciclo, plantas de duas repetições do CTT e cinco repetições do CST apresentaram esse sintomas. Entender melhor as respostas de clones de eucalipto a SPEVRD tem sido um tema recorrente no que respeita os estudos sobre essa espécie. Não obstante, estar preparado para uma detalhada investigação quando do aparecimento dos sintomas a nível de campo e ainda mais complicado e, assim, conseguir a reprodução em casa de vegetação da sintomatologia usualmente observada tem se mostrado uma tarefa arduamente complicada.

Em síntese, os resultados aqui apresentados indicam que os clones sujeitos a ciclos recorrentes de estresses apresentam respostas distintas daquelas observadas após uma única situação de estresse. Ademais, a segunda exposição ao estresse melhorou,

significativamente, o desempenho fotossintético sem ocasionar possíveis danos ao aparato fotossintético.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida AQ, Ribeiro A, Leite FP** (2013) Relação entre a seca dos ponteiros do eucalipto e o clima no Vale da Bacia Hidrográfica do Rio Doce. Espírito Santo doPinhal, v. 10, n. 1:005-013.
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR** (2011) Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci* **16**:489–498.
- Bruce T. J. A, Matthes M. C, Napier J. A, Pickett J. A** (2007) Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* **173**: 603–608.
- Byun Y-J, Koo M-Y, Joo H-J, Ha-Lee Y-M, Lee D-H** (2014) Comparative analysis of gene expression under cold acclimation, deacclimation and reacclimation in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, **152**: 256-274.
- Cairo PAR** (1995) Curso Básico de Relações Hídricas de Plantas. UESB, Vitória da Conquista.
- Chen JW, Zhang Q, Li XS, Cao KF** (2010) Gas exchange and hydraulics in seedlings of *Hevea brasiliensis* during water stress and recovery. *Tree Physiology* **30**:876–885.
- Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ** (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, **2**.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt, M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* **142**:1574–1588.
- Ding Y, Fromm M, Avramova Z** (2012) Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, **3**: 1-9.
- Ferner E, Rennenberg H, Kreuzwieser J** (2012) Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. *Tree Physiology* **32**:135–145.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ** (2001) Fructose 2,6- biphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase and increases

- triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250-263.
- Ferreira FA** (1989) *Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa: SIF, 1989. 570p.
- Ferreira FA** (1986) *Principais doenças do eucalipto no Estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte, EPAMIG, 32p. (Boletim Técnico, 23).
- Fleta-Soriano E, Munné-Bosch S** (2016) Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1-6.
- Flexas J, Galmes J, Ribas-Carbo M, Medrano H** (2005) The effects of water stress on plant respiration. In book: *Plant Respiration*, pp.85-94.
- Gallé A, Florez-Sarasal I, Aououadi HE, Flexas J** (2011) The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimation to repeated drought and re-watering cycles. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 1-10.
- Hildebrandt TM, Nunes Nesi A, Araújo WL, Braun HP** (2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol. Plant* **8**: 1563–1579.
- Hsu YM, Tseng MJ, Lin CH** (1999) The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **40**: 193-198.
- Hu T, Jin Y, Li H, Amombo E, Fu J** (2016) Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, **156**: 54-69.
- Hu T, Liu S-Q, Amombo E, Fu J-M** (2015) Stress memory induced rearrangements of *HSP* transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 1-13.
- Hunt R** (1982). *Plant Growth Curves: the Functional Approach to Plant Growth Analysis*. Edward Arnold, London.
- Iwasaki M, Paszkowski J** (2014) Epigenetic memory in plants. *The Embo Journal*, **33**: 1-12.
- Lawlor DW & Cornic G** (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **25**:275–294.
- Leite FP, Novais RF, Silva IR, Barros NF, Neves JCL, Medeiros AGB, Ventrella MC, Villani EMA** (2014) Manganese accumulation and its relation to "eucalyptus

shoot blight in the Vale do Rio Doce". Rev. Bras. Ciênc. Solo vol.38 n°.1 Viçosa Jan./Feb.

- Li C, Jiang D, Wollenweber B, Li Y, Dai T, Cao W** (2011) Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. *Plant Science* **180**:672–678.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387-396.
- Liu Z, Cheng R, Xiao W, Guo Q, Wang N** (2014) Effect of Off-Season Flooding on Growth, Photosynthesis, Carbohydrate Partitioning, and Nutrient Uptake in *Distylium chinense*. *Plos One* 9(9): e107636.
- Martorell S, Diaz-Espejo A, Medrano H, Ball MC, Choat B** (2014) Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. *Plant, Cell and Environment* **37**:617–626.
- Mitchell PJ, O’Grady AP, Tissue DT, Worledge D, Pinkard EA** (2014) Coordination of growth, gas exchange and hydraulics define the carbon safety margin in tree species with contrasting drought strategies. *Tree Physiology* **34**: 443–458.
- Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB, Daloso DM, Pham PA, Barros KA, Engqvist MK, Florian A, Krahnert I, Maurino VG, Araújo WL, Fernie AR** (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **39**:1304–1319.
- Tan W, Liu J, Dai T, Jing Q, Cao W, Jiang D** (2008) Alterations in photosynthesis and antioxidant enzyme activity in winter wheat subjected to post-anthesis waterlogging. *Photosynthetica* **46** (1): 21-27.
- Turner N & Begg, JE & Tonnet, ML.** (1978). Osmotic Adjustment of Sorghum and Sunflower Crops in Response to Water Deficits and Its Influence on the Water Potential at Which Stomata Close. *Functional Plant Biology*. 5. 597-608.
- Vriet C, Hennig L, Laloi C** (2015) Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences* Vol. 72, Issue 7: 1261–1273.
- Walter J, Jentsch A, Beierkuhnlein C, Kreyling J** (2013) Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in climate extremes. *Environmental and Experimental Botany*, **94**: 3-8.

- Walter J, Nagy L, Hein R, Rascher U, Beierkuhnlein C, Willner E, Jentsch A** (2011) Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany* **71**:34–40.
- Wample RL, Davis RW** (1983) Effect of Flooding on Starch Accumulation in Chloroplasts of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Physiol.* **73**:195-198.
- Wang X, Vignjevic M, Jiang D, Jacobsen S, Wollenweber B** (2014) Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var.Vinjett. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 22.: 6441–6456.
- Wellburn AR** (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Physiol.* **144**:307–313.

## 6- MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1: Análise química do substrato

Identificação da amostra	N	P	K	Ca	Mg	S	CO	C/N
	.....%.....						(%)	
Substrato	0,50	0,21	0,20	1,38	0,98	0,36	8,89	17,78

Identificação da amostra	Zn	Fe	Mn	Cu	B	pH	Na
	.....ppm.....					(H <sub>2</sub> O)	(%)
Substrato	27	11379	123	18	9,1	5,86	0,004

Teores Totais, determinados no extrato ácido (ácido nítrico com ácido perclórico)

N-Método do Kjeldahl

CO-Método Walkley-Black

Identificação da amostra	Teor de Umidade (%)	
	Ao ar	Estufa 75 °C
Substrato	31,40	32,28

## 7- CONCLUSÃO GERAL

Em suma, os resultados fisiológicos e metabólicos aqui apresentados indicam que apenas um ciclo de alagamento e secagem não é capaz de desencadear respostas que permitam distinguir os mecanismos adotados por clones contrastante a SPEVRD mediante flutuações na disponibilidade hídrica. Ademais, como observado no capítulo 1, nota-se que ambos os clones se comportaram de maneira muito similar no que respeita as variáveis fisiológicas e metabólicas; contudo, embora o clone tolerante apresente reduções nos parâmetros de trocas gasosas e também no  $\Psi_w$  foliar mais rapidamente que o sensível, o primeiro aparentemente apresenta mecanismos de quiescência, como previamente relatado em outros trabalhos. Além disso, a alocação diferencial de biomassa nos diferentes órgãos, destacando-se aumentos expressivos no sistema radicular, parece possibilitar uma maior “tolerância” desse clone aos dois eventos sucessivos de estresse.

Concomitantemente, os resultados aqui obtidos sugerem que a imposição de ciclos consecutivos de estresse (Capítulo 2) promova respostas diferenciais e que permitam, de certo modo, favorecer um melhor desempenho do clone tolerante. Assim, os resultados aqui obtidos apresentam evidências de que plantas de eucalipto sujeitas a múltiplos eventos de estresse são capazes de lidar melhor com o alagamento que aquelas submetidas a esse estresse pela primeira vez. Além disso, sugere-se também a existência de uma “memória ao estresse” associada ao metabolismo em clones de eucalipto e que análises futuras envolvendo ferramentas metabólicas e moleculares mais sofisticadas serão fundamentais para se compreender, em detalhes, os sintomas associados à SPEVRD. Adicionalmente, é plausível sugerir que a aclimação diferencial de clones de eucalipto a eventos múltiplos de estresse hídrico, seja por falta ou excesso, parece ser dependente de um reajuste fino de processos metabólicos incluindo fotossíntese, respiração e metabolismo de açúcares e aminoácidos. Não obstante, tal aclimação diferencial observada entre clones tolerantes e sensíveis parece envolver mecanismos distintos associados a um estado de alerta e um mecanismo de quiescência e economia energética em materiais mais tolerantes. Assim, o estudo aqui descrito oferece novas perspectivas para se elucidar os mecanismos de tolerância diferencial a SPEVRD. Nesse contexto, com o intuito de se compreender, de modo mais detalhado, as estratégias adotadas por cada material estudos adicionais envolvendo ferramentas de transcriptoma, metabolômica e associadas à epigenética serão ainda necessárias para, assim, identificar

pontos chave que possam auxiliar na identificação precoce de materiais mais promissores em condições de campo.