

**FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA DIFERENCIAL DE CLONES DE EUCALIPTO A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E DE OXIGÊNIO**

**VIÇOSA-MG**

**2014**

**FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA DIFERENCIAL DE CLONES DE EUCALIPTO A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E DE OXIGÊNIO**

Trabalho final de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como  
parte das exigências da disciplina ENF  
499 para obtenção do título de bacharel  
em Engenharia Florestal

**VIÇOSA-MG**

**2014**

**FRANCIELE SANTOS OLIVEIRA**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA DIFERENCIAL DE CLONES DE EUCALIPTO A DEFICIÊNCIA  
HÍDRICA E DE OXIGÊNIO**

Trabalho final de curso apresentado à  
Universidade Federal de Viçosa como  
parte das exigências da disciplina ENF  
499 para obtenção do título de bacharel  
em Engenharia Florestal

APROVADA em Dezembro de 2014

---

Prof. Adriano Nunes Nesi  
(CO-ORIENTADOR)

---

Dr. Jorge Pérez Díaz  
(CO-ORIENTADOR)

---

Prof. Wagner Luiz Araújo  
(ORIENTADOR)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por revitalizar minhas forças e minha fé a cada dia.

A minha mãe Amélia, pelo amor, conselhos, por acalmar meu coração nos dias em que tudo parecia difícil e por não medir esforços para que meus sonhos fossem alcançados.

Ao meu pai, Carlos, pelo amor, conselhos e por ensinar-me a correr atrás dos objetivos.

A minha irmã, Michely, pela amizade, compreensão e por ter palavras certas sempre que precisei.

Ao meu orientador, Wagner L. Araújo, pelos ensinamentos, orientação, apoio e oportunidades que me concedeu na graduação.

Ao professor Ivo Ribeiro da Silva, pelas sugestões e orientação.

A todos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas e da Unidade de Crescimento de Plantas em especial a Dora, com quem tive oportunidade de aprender muito ao longo dessa caminhada e que foi de fundamental importância para conclusão dessa etapa, e ao Dalton, que também me auxiliou para que isso fosse possível.

Aos meus amigos, pelo apoio, pelas histórias e companheirismo que essa trajetória fosse tão especial.

As amigas com quem morei esses cinco anos, pelo apoio, paciência e pelos bons momentos compartilhados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Florestal pelo aprendizado, amizade e por contribuir para meu crescimento pessoal e profissional.

A Sociedade e Investigações Florestais pela concessão da bolsa de estágio.

Ao Medina e a Maria, pelo apoio e amizade.

Aos amigos da UFV Jr. Florestal, pelo aprendizado.

## **BIOGRAFIA**

Franciele Santos Oliveira, filha de Maria Amélia Santos Oliveira e Carlos Tarcísio de Oliveira, nasceu aos 03 dias do mês de maio de 1992, em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais. Estudou no Colégio Municipal Rio Branco onde concluiu o Ensino Fundamental e o Ensino Médio. Em 2010 iniciou o curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa. Em 2011 foi estagiária na Unidade de Crescimento de Plantas no Departamento de Biologia Vegetal sendo também membro do Centro Acadêmico de Engenharia Florestal. Em 2012 foi bolsista de Iniciação Científica FUNARBIC na área de Fisiologia Vegetal e em 2013 estagiária da Sociedade de Investigações Florestais. Atualmente é estagiária da Sociedade de Investigações Florestais na Ecofisiologia Vegetal/Unidade de Crescimento de Plantas sob orientação do Professor Wagner L. Araújo e coordenação do Professor Ivo Ribeiro da Silva. Também atua na UFV Jr. Florestal como Gerente de Administrativo-Financeiro e do Núcleo de Responsabilidade Sócio empresarial.



4.1.4. Determinação de aminoácidos totais .....	16
4.2. Experimento de Déficit hídrico .....	17
4.2.1. Determinação do potencial hídrico .....	17
4.2.2. Determinação de massa fresca e massa seca .....	19
4.2.3. Determinação da área foliar específica .....	20
4.2.4. Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	20
4.2.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos .....	24
4.2.6. Determinação de prolina e glicina-betaína.....	25
4.2.7. Determinação de proteínas totais.....	27
4.2.8. Determinação de aminoácidos totais .....	27
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1. Experimento de Hipoxia.....	29
5.2. Experimento de Déficit hídrico .....	31
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>36</b>

## EXTRATO

OLIVEIRA, Franciele Santos. Monografia do curso de graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2014. **Aspectos fisiológicos e metabólicos envolvidos na resposta diferencial de clones de eucalipto a deficiência hídrica e de oxigênio.** Orientador: Wagner L. Araújo. Co-orientadores: Adriano Nunes-Nesi e Jorge Pérez Díaz.

No Brasil, a área plantada com eucalipto utilizada para atender os diversos setores florestais vem sofrendo incrementos constantes nos últimos anos mesmo com as mudanças climáticas observadas. Essas alterações levam a uma anomalia que vem sendo notada em alguns plantios conhecida como seca de ponteiros. Esta anomalia é normalmente observada após o período chuvoso, em que o excesso de água no solo compromete a sobrevivência da espécie. Os sintomas da seca de ponteiros são caracterizados pela perda de dominância apical, lesões nos ramos e nas folhas, murcha, podendo levar a seca de ponteiros propriamente dita. Nesse sentido faz-se necessário entender como algumas variáveis climáticas afetam o desenvolvimento de clones comumente utilizados em plantios florestais. Com isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os impactos fisiológicos e metabólicos causados pelo déficit hídrico e pela deficiência de oxigênio em clones de eucalipto sensível e tolerante a seca de ponteiros. Para tanto, dois experimentos independentes foram montados, sendo o

primeiro feito para investigar os efeitos da redução na disponibilidade de oxigênio (hipoxia) e o segundo os impactos do déficit hídrico. O primeiro trabalho seguiu-se um esquema fatorial 2x2, utilizando-se dois clones (tolerante e sensível à seca de ponteiros) e duas concentrações de oxigênio (normoxia 8 mg/L e hipoxia 4 mg/L). No segundo trabalho também se seguiu um esquema fatorial 2x2 (dois clones e dois regimes hídricos). Em ambos os experimentos foram avaliados trocas gasosas, teor de clorofila, aminoácidos totais e proteínas totais. De maneira particular, no experimento com déficit hídrico, determinou-se, ainda, a área foliar específica, matéria fresca e seca, prolina e glicina-betaína. Coletivamente, os resultados obtidos demonstram que o período curto de hipoxia promove alterações na fotossíntese, transpiração, taxa de transporte de elétrons, teor de clorofilas, aminoácidos e proteína, indicando uma extensiva reprogramação metabólica após a redução na concentração de oxigênio. Cabe mencionar, no entanto, que essa resposta precisa ainda ser melhor investigada. O déficit hídrico promove reduções significativas nos parâmetros de trocas gasosas em ambos os clones. Saliente-se que esses parâmetros foram recuperados após trinta dias de reirrigação, e que ao final do experimento a superioridade do clone sensível nessa recuperação. As reduções nas trocas gasosas foram acompanhadas por quedas nos teores de clorofila total sem, no entanto, alterar a razão clorofila *a/b*. Embora reduções na eficiência fotoquímica do fotossistema II mensurada pela razão  $F_v/F_m$  tenham sido observadas, não se observou um padrão claro de flutuação dos teores de prolina e glicina-betaína nos clones avaliados. Tomados em conjunto os resultados obtidos sugerem que a ocorrência de limitações estomáticas e fotoquímicas associadas ao estresse hídrico tenham sido fortemente responsáveis pelas mudanças metabólicas observadas e indicam que futuros estudos metabólicos devam auxiliar na elucidação das respostas contrastantes dos clones ora avaliados.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios enfrentados pelo setor florestal, não apenas brasileiro, mas também mundial, é o crescente aumento na demanda por madeira nas últimas décadas devido, em grande parte, ao seu maior consumo em múltiplos setores da indústria, a fim de atender às exigências do mercado. Para atender a demanda e exigências do mercado, destacam-se algumas espécies florestais como o *Eucalyptus* e o *Pinus*. Nesse contexto, durante o ano de 2013 a área ocupada por florestas plantadas foi de 6,66 milhões de hectares sendo que deste total, 76,6% da área é ocupado por *Eucalyptus* e 23,4% ocupado por *Pinus* (ABRAF, 2013). Cabe mencionar que o *Eucalyptus* apresenta algumas características mais recomendáveis como menor ciclo de corte, rápido crescimento e tratos silviculturais conhecidos. Dessa forma, por ser um gênero que atende às exigências das indústrias justifica-se a grande área de plantio normalmente utilizada (FERRAZ, 2012).

É notório que para se obter maior produtividade necessita-se entender como variáveis climáticas (e.g. umidade, temperatura, radiação, quantidade de oxigênio, limitação hídrica) afetam o desenvolvimento, particularmente, na fase juvenil do *Eucalyptus*. Nesse sentido, é imprescindível avaliar como essas variações comprometem o desenvolvimento do eucalipto frente a essas variações, uma vez que, a escolha do material genético deve ser criteriosa a fim de proporcionar maior adaptabilidade e desenvolvimento da espécie no sítio florestal, especialmente nas questões que envolvam

a sobrevivência mediante ao déficit de água no solo provocado por diferentes características não apenas do solo mais também das variáveis climáticas, principalmente o que tange ao índice de precipitação pluviométrica (TUOMELA, 1997 citado por FERNANDES, 2012).

No entanto, em determinadas circunstâncias, água em demasia no solo também pode comprometer a produção de eucalipto. De maneira geral, plantas que se desenvolvem nessas condições apresentam comumente perdas de produtividade, pois o crescimento é severamente comprometido (TAIZ E ZEIGER, 2004). Esse fenômeno de alagamento do solo causa hipoxia onde a concentração de oxigênio é reduzida, limitando energeticamente as plantas e ocasionando, em última instância, as reduções no crescimento. Registre-se que em ambos os casos (falta ou excesso de água), os problemas comumente observados vem sendo um grande desafio enfrentado pelo setor florestal, uma vez que o eucalipto é bastante sensível tanto ao excesso de água quanto à deficiência de oxigênio nos solos (EMBRAPA, 2000).

Muito provavelmente devido às variações climáticas, têm-se observado que diferentes clones de eucalipto apresentam diferenças no crescimento e desenvolvimento, particularmente quando situações de estresse são aparentes. Neste contexto, em determinadas áreas de plantio com altos índices pluviométrico tem se observado a ocorrência da seca de ponteiros. Essa anomalia é normalmente observada após o período chuvoso devido ao excesso de água no solo que compromete grandemente a sobrevivência da espécie (ALMEIDA *et al.*, 2013). A escolha de materiais genéticos resistentes a essa condição é uma das alternativas utilizadas para evitar os prejuízos da seca de ponteiro em áreas de cultivo. A seca de ponteiros é observada em diferentes regiões do estado de Minas Gerais sendo primeiramente constatada no Vale do Rio Doce. Cabe ressaltar que essa anomalia apresenta-se inicialmente com a sintomatologia de perda na dominância apical, lesões nos ramos e nas folhas, murcha aparente, encarquilhamento e trincamento da casca e, em última instância, a seca de ponteiros, propriamente dita (FERREIRA & MILANI, 2002; ALFENAS, 2004).

Os danos fisiológicos provocados são devido ao excesso de água no solo que geram distúrbios no processo fotossintético, principalmente no que diz respeito às trocas gasosas, deficiência na absorção e translocação de nutrientes, afetando, de forma substancial, o metabolismo da planta (ALMEIDA *et al.*, 2013). Ademais, parece afetar

também a fina regulação hormonal em plantas levando, por exemplo, ao aumento na síntese de etileno na parte aérea provocando assim a epinastia das folhas. Com efeito, o ácido abscísico, que atua na regulação do processo de abertura e fechamento dos estômatos, pode também desempenhar papel importante na regulação das trocas gasosas em resposta à hipoxia (TAIZ E ZEIGER, 2004). Registre-se também que para sobreviver em situações de baixa concentração de oxigênio, plantas consideradas tolerantes podem apresentar diferentes mecanismos. Assim, sob hipoxia, a raiz pode desenvolver estruturas anatômicas especializadas como aerênquima, raízes adventícias e lenticelas (KOZLOWSKI, 1997; HERRERA, 2013 citado por KREUZWIESER E RENNENBERG, 2014). Cumpre mencionar que devido à baixa disponibilidade de oxigênio, alterações na atividade respiratória radicular são normalmente observadas promovendo estímulo ao metabolismo fermentativo. Nesse contexto, a regeneração do  $\text{NAD}^+$  (adenina dinucleotídeo de nicotinamida) por meio da via fermentativa permite a dissipação desse poder redutor permitindo a manutenção da via glicolítica gerando energia na forma de ATP, mesmo que em baixas quantidades, possibilitando a manutenção temporária do metabolismo do sistema radicular através da fosforilação oxidativa a nível de substrato (ROCHA *et. al.*, 2010).

Saliente-se também que em condição de hipoxia um significativo acúmulo de metabólitos alanina,  $\gamma$ -amino butírico (GABA) e succinato são observados, sugerindo uma reprogramação metabólica durante ao estresse causado pela baixa concentração de oxigênio fortemente associado à manutenção de taxas respiratórias (ROCHA *et. al.*, 2010). Entretanto, plantas que são tolerantes à hipoxia tendem a ser sensíveis ao déficit hídrico, devido à limitação de absorção de água de suas raízes superficiais (KOZLOWSKI, 1997).

De modo similar ao fenômeno da hipoxia, a deficiência hídrica pode comprometer o desenvolvimento e a produtividade vegetal. A síntese de osmólitos, solutos compatíveis, é geralmente observada em resposta ao déficit hídrico. Nesse sentido, esses solutos podem ser acumulados sem causar danos ao papel das proteínas. Estes osmólitos compreendem aminoácidos (prolina), açúcares (frutanos) e compostos de amônios quaternários (glicina-betaína). Para a síntese desses solutos a atuação das enzimas envolvidas é de fundamental importância, o que permite que ocorra o ajustamento osmótico. Esse ajustamento implica em um decréscimo do potencial

osmótico, que pode auxiliar na manutenção de um gradiente de potencial hídrico favorável bem como proteger o turgor da célula (BRAY, 1997).

Em consequência da limitação hídrica no solo, ocorre o fechamento estomático, que é regulado, dentre outros fatores, pela concentração de ácido abscísico (PACHECO, 2007). Com efeito, o déficit hídrico promoveu declínios na taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e potencial hídrico em clones de eucalipto (TATAGIBA, 2008), fato esse possivelmente associado a alterações nas concentrações de ácido abscísico.

Coletivamente, as informações apresentadas acima indicam que o comportamento de clones de eucalipto frente a situações de limitação hídrica ou de oxigênio pode ser fortemente governado por mudanças metabólicas. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar as alterações bioquímicas e fisiológicas em diferentes clones de eucalipto, submetidos à limitação hídrica (déficit hídrico) e hipoxia. Registre-se aqui que o estudo detalhado dos possíveis mecanismos que tornam clones de eucalipto sensíveis ou tolerantes a essas condições potencialmente possibilitará a identificação de pontos de controle metabólico facilitando, a longo prazo, a seleção de materiais tolerantes auxiliando também a programas de melhoramento genético dessa espécie.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1.1. *Objetivo geral:*

Pretendeu-se nesse trabalho avaliar os impactos fisiológicos e metabólicos causados pelo déficit hídrico e pela deficiência de oxigênio em clones de eucalipto sensível e tolerante à seca de ponteiros.

### 2.1.2. *Objetivos específicos:*

Analisou-se características metabólicas dos diferentes clones de eucalipto, no que se refere:

- ✓ Trocas gasosas;
- ✓ Matéria seca e fresca;
- ✓ Área foliar específica;
- ✓ Quantificação de frações nitrogenadas (aminoácidos e proteínas);
- ✓ Quantificação de pigmentos fotossintéticos;
- ✓ Determinação de prolina e glicina-betaína;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Experimento I – Hipoxia

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais. As mudas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* que usualmente apresentavam sintomas do distúrbio de seca de ponteiros (clone sensível) e mudas que não apresentam esses sintomas e que são consideradas resistentes a essa anomalia (clone tolerante), ambos do mesmo material genético e classificado dessa forma com base em fenotipagem de campo, foram gentilmente cedidas pela empresa Veracel. Esses clones foram cultivados em condições de hidroponia sendo inicialmente utilizada a solução de Clark com ¼ de força (CLARK, 1975). Após seis dias a solução foi trocada para ½ força e essa concentração foi usada até o final do experimento sendo usualmente renovada a cada seis dias. No décimo quinto dia após o início de condução do experimento aplicou-se o tratamento com hipoxia. Para isso, injetou-se nitrogênio na solução a fim de manter a concentração de O<sub>2</sub> a 4mg L<sup>-1</sup> (condição de hipoxia) e o controle foi mantido em condições normais de oxigênio (8 mg L<sup>-1</sup>).O experimento foi

montado em esquema fatorial 2x2, dois clones (tolerante e sensível à seca de ponteiros) e duas concentrações de oxigênio (normoxia 8 mg L<sup>-1</sup> e hipoxia 4mg L<sup>-1</sup>) em blocos inteiramente casualizados com seis repetições.

### 3.1.1. Coleta de material vegetal

A coleta de amostra do tecido foliar e do sistema radicular foram realizadas após a imposição do tratamento. O intervalo da coleta ocorreu da seguinte forma: após 3 horas, 24 h, 120 h (5º dia) e 264 h (11º dia) de submissão ao tratamento. No décimo primeiro dia após a hipoxia o experimento foi desmontado. Após a coleta do material vegetal as amostras foram maceradas e armazenadas a -80°C para posteriores análises.

### 3.1.2. Análise de trocas gasosas

Para avaliar os parâmetros de trocas gasosas, após quinze dias do cultivo em hidroponia foram feitas medições (dia 0, antes da submissão do estresse) e no quinto dia após a imposição da hipoxia. As análises foram realizadas no terceiro par de folhas completamente expandidas. Para isso, utilizou-se um sistema aberto com analisador de gases infravermelho com fluorômetro acoplado (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) determinando-se a taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> ( $C_i/C_a$ ), transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), com concentração de CO<sub>2</sub>, temperatura e vapor de água ambientes.

### 3.1.3. Extração e determinação de pigmentos fotossintéticos, aminoácidos e proteínas

Foram pesadas amostras de aproximadamente 25 mg do material macerado, e em seguida foram submetidas à extração metanólica a quente. Nesse extrato foram determinados os teores de clorofilas ( $a$  e  $b$ ), em leitor de microplacas de ELISA, e calculada segundo (PORRA *et al.*, 1989) bem como os teores de clorofila totais e a razão clorofila  $a/b$ . Na fração solúvel em água, foram determinados os teores de aminoácidos totais (SIENKIEWICZ-PORZUCEK *et al.*, 2008) e na fração insolúvel, o conteúdo de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976).

### ***3.2. Experimento II- Déficit hídrico***

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais. As mudas de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* que usualmente apresentavam sintomas do distúrbio de seca de ponteiros (clone sensível) e mudas que não sofriam essa anomalia (clone tolerante) foram gentilmente cedidas pela empresa Veracel. As mudas foram transferidas do tubete para vasos com capacidade de 5 litros. O substrato estava previamente adubado com N-P-K 4-14-8. As plantas foram cultivadas por um período de cinco meses e nesse intervalo de tempo foram feitas mais duas adubações: a primeira em plantas com quatro meses de cultivos e que continha essencialmente macro e micronutrientes (WAUGHT & FITTS, 1966 modificado por ALVAREZ, 1974) e a segunda com plantas de cinco meses com N-P-K 4-14-8. Após quatorze dias de aplicação do fertilizante, as plantas foram submetidas à restrição hídrica.

O potencial hídrico foi acompanhado após a aplicação do estresse na antemanhã com o auxílio de bomba de pressão (Bomba de Scholander). No terceiro dia as plantas atingiram o potencial hídrico de aproximadamente -1,5 MPa. Foram utilizadas doze plantas de cada clone, sendo seis não irrigados e seis irrigados, totalizando vinte e quatro plantas. Seguiu-se um esquema fatorial 2x2 (dois clones e dois regimes hídricos) delineamento em blocos casualizados com seis repetições.

#### ***3.2.1. Coleta de material vegetal***

Após atingir o potencial hídrico, foram coletadas folhas inteiras, completamente expandidas, para análises bioquímicas. Em seguida, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posteriores análises.

### 3.2.2. Determinação da área foliar específica

Ao final do experimento foram coletados quinze discos foliares de cada planta, e estas foram levadas à estufa de circulação forçada de ar a 70°C. A área foliar foi determinada pela razão área foliar/massa seca.

### 3.2.3. Determinação de massa fresca e seca

Ao término do experimento as plantas foram divididas em folha, caule e raiz e determinou-se a massa fresca. Em seguida, as amostras foram levadas à estufa de circulação forçada de ar a 70°C e após atingir massa constante foi determinada a massa seca.

### 3.2.4. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Foram feitas análises dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* antes da imposição do estresse, após atingir o potencial hídrico desejado e nessas mesmas plantas trinta dias após a completa reidratação. Para isso, utilizou-se um sistema aberto com analisador de gases infravermelho com fluorômetro acoplado (IRGA, Li-cor Inc. LI-6400XT, Lincoln, EUA) a fim de determinar a taxa de assimilação líquida do carbono ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a razão entre a concentração interna e externa ( $C_i/C_a$ ) de  $\text{CO}_2$ , transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), com concentração de  $\text{CO}_2$ , temperatura e vapor de água ambientes, fluorescência mínima ( $F_0$ ), fluorescência máxima emitida ( $F_m$ ) dentre outros parâmetros relacionados à fluorescência.

### 3.2.5. Análise de pigmentos fotossintéticos, aminoácidos e proteína

Foram pesadas amostras de aproximadamente 25 mg do material macerado, e em seguida foram submetidas à extração metanólica a quente. Nesse extrato foram determinados os teores de clorofilas (*a* e *b*), em leitor de microplacas de ELISA, e calculada segundo (PORRA *et al.*, 1989) bem como os teores de clorofila totais e a

razão clorofila *a/b*. Na fração solúvel em água, foi determinado os teores de aminoácidos totais (SIENKIEWICZ-PORZUCEK *et al.*, 2008) e na fração insolúvel, o conteúdo de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976)

### *3.2.6. Quantificação de prolina e glicina-betaína*

Foram pesados em média 30 mg de tecido vegetal para as análises. A quantificação de prolina foi feita segundo Bates *et. al* 1973 e de glicina-betaína conforme descrito por Greive e Grattan 1983.

## 4. RESULTADOS

### *4.1. Experimento I- Hipoxia*

#### *4.1.1. Trocas gasosas*

Sabendo-se que a redução nas concentrações de oxigênio promove alterações nas plantas no que diz respeito a sua fisiologia, os parâmetros de trocas gasosas foram medidos em dois pontos do experimento a fim de observar o comportamento de tais fenômenos. No dia zero (antes da aplicação do estresse), foi possível observar que os clones apresentam diferenças na taxa fotossintética (Figura 1A), destacando-se que o clone tolerante antes da imposição do estresse apresentou uma diminuição desse parâmetro. No quinto dia de hipoxia não foram observadas diferenças significativas em relação a esse parâmetro indicando uma possível recuperação do clone tolerante. Ao analisarem-se os clones ao longo do tempo, pode-se ressaltar que há um aumento da fotossíntese do clone tolerante na condição de hipoxia (Figura 1A).

No que se refere à quantidade de CO<sub>2</sub> que é difundido do ambiente para as células do mesófilo, condutância estomática ( $g_s$ ), podemos observar que não há diferença antes e após a imposição do estresse bem como ao longo do tempo, sugerindo que a mesma quantidade de CO<sub>2</sub> está entrando na célula de ambos os clones (Figura 1B) e que as

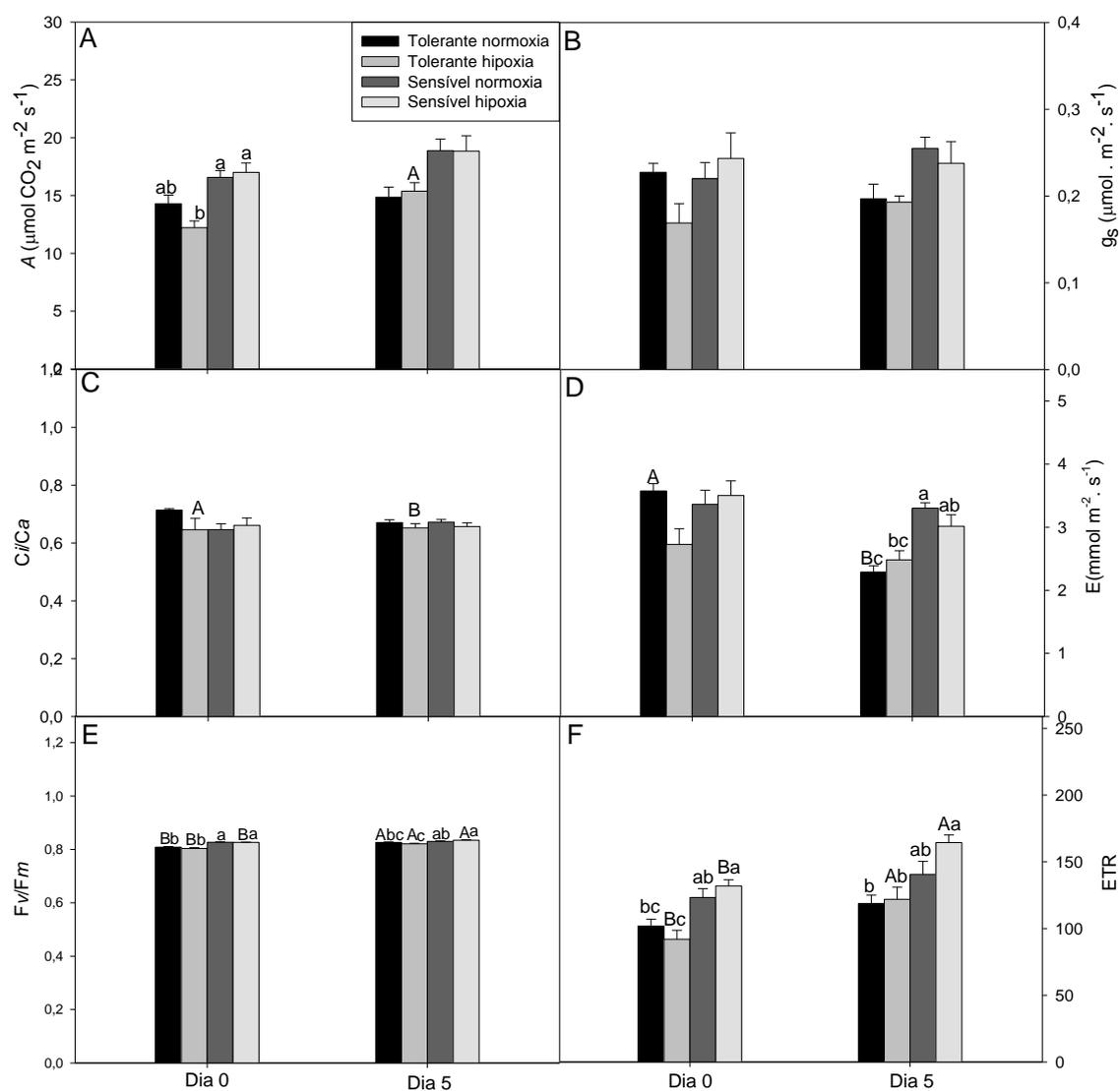
diferenças observadas na fotossíntese possam estar mais fortemente associadas a limitações bioquímicas do que a limitações estomáticas.

A razão entre a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e concentração externa ( $C_a$ ) é um parâmetro que pode indicar possíveis limitações difusivas e bioquímicas na assimilação de  $\text{CO}_2$  (FARQUHAR e SHARKEY, 1982). Desse modo, nota-se que tanto no dia zero quanto no dia cinco não ocorreram mudanças significativas, ao passo que ao longo do tempo de estresse o clone tolerante na condição de normoxia apresentou um minoritário decréscimo (Figura 1C).

A transpiração dos clones no dia zero não apresentou diferenças significativas. No entanto, no quinto dia foram obtidos maiores valores para o clone sensível em ambas as condições e menores para o clone tolerante, valor este ainda menor em condições de normoxia (Figura 1D). Coletivamente, esses resultados suportam a noção de que menores taxas fotossintéticas foram observadas nessa situação resultando, assim, em uma menor perda de água.

A razão  $F_v/F_m$  indica o rendimento quântico fotoquímico máximo do fotossistema II (PSII) possuindo valor ideal em torno de 0,83 (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987). Embora sejam encontradas diferenças em ambos os dias de análise e ao longo do tempo, estas não indicam danos ao PSII, uma vez que os valores atingidos estão dentro da faixa ideal. No entanto, podem-se destacar maiores valores para os clones sensíveis (Figura 1E).

Ademais, a taxa de transporte de elétrons (ETR) do clone tolerante sob condições de hipoxia e normoxia foi sempre menor nos dois dias de análise ao se comparar ao observado no clone sensível. Registre-se também, ao longo do tempo, um aumento na taxa de transporte de elétrons nos clones tolerante e sensível, sendo no último foi observado um valor ainda maior (Figura 1F).

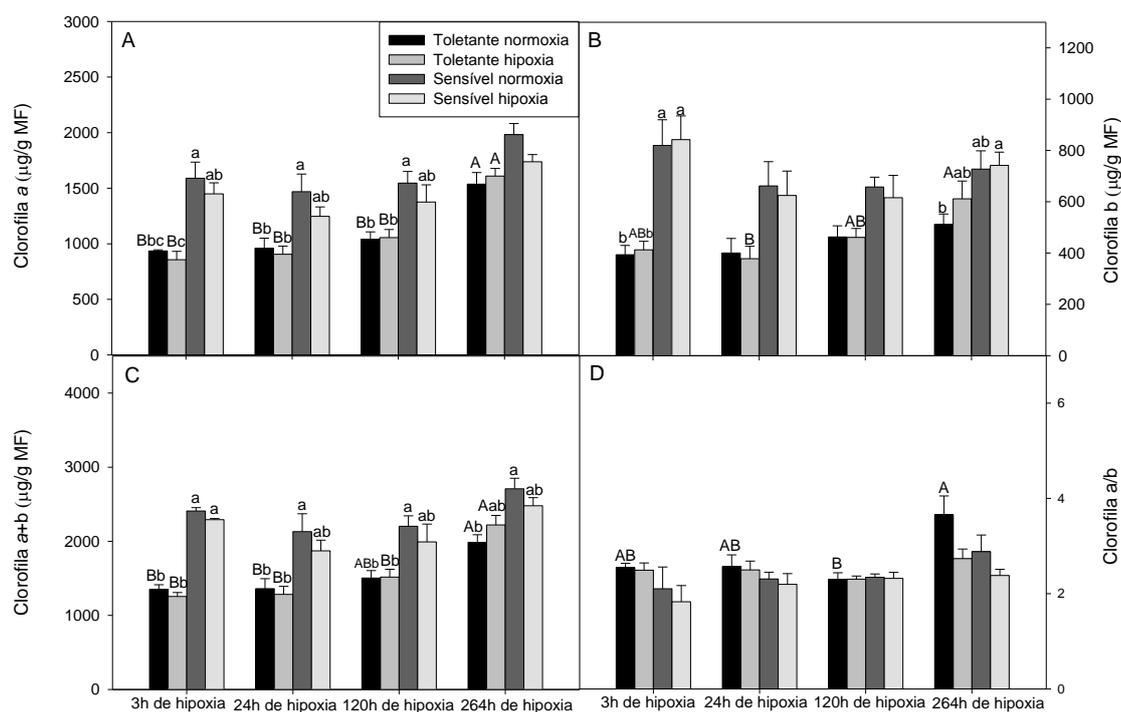


**Figura 1-** Parâmetros de trocas gasosas antes da imposição da hipoxia e com cinco dias de estresse: fotossíntese (A), condutância estomática (B),  $C_i/C_a$  (C), transpiração (D),  $F_v/F_m$  (E) e ETR (F). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.1.2. Determinação de pigmentos fotossintéticos

Com o intuito de se entender as variações nos parâmetros de trocas gasosas o conteúdo dos pigmentos fotossintetizantes foi determinado. É possível notar que o clone sensível apresenta um maior teor de clorofila *a* nas duas condições com três horas de hipoxia. Esse padrão foi seguido até 120 horas de estresse. Cumpre mencionar que após 264 horas de hipoxia não houve diferenças nos tratamentos. Avaliando o comportamento de cada tratamento ao longo do tempo, de modo interessante, o clone tolerante em condição normal e sob deficiência de O<sub>2</sub> aumentou seu teor de clorofila *a* sendo possível detectá-lo na análise feita no período de 264 horas de estresse (Figura 2A). O mesmo padrão foi seguido pelo teor de clorofila *b*, ressaltando que somente o clone tolerante sob deficiência de O<sub>2</sub> apresentou aumentos ao longo do tempo (Figura 2B).

Como esperado, em função dos teores de clorofila *a* e *b*, o teor de clorofilas totais também seguiu o mesmo comportamento, e assim, nas primeiras horas de hipoxia os clones sensíveis nos dois tratamentos obtiveram maiores valores enquanto que o contrário foi observado no clone tolerante. Embora tenha sido menor, estes conseguiram aumentar os teores ao longo do tempo (Figura 2C). A razão entre clorofila *a* e *b* não apresentou diferenças estatísticas significativas nos tempos de análise, embora aumentos desta razão ao longo do tempo no clone tolerante em condições normais tenham sido notados (Figura 2D).



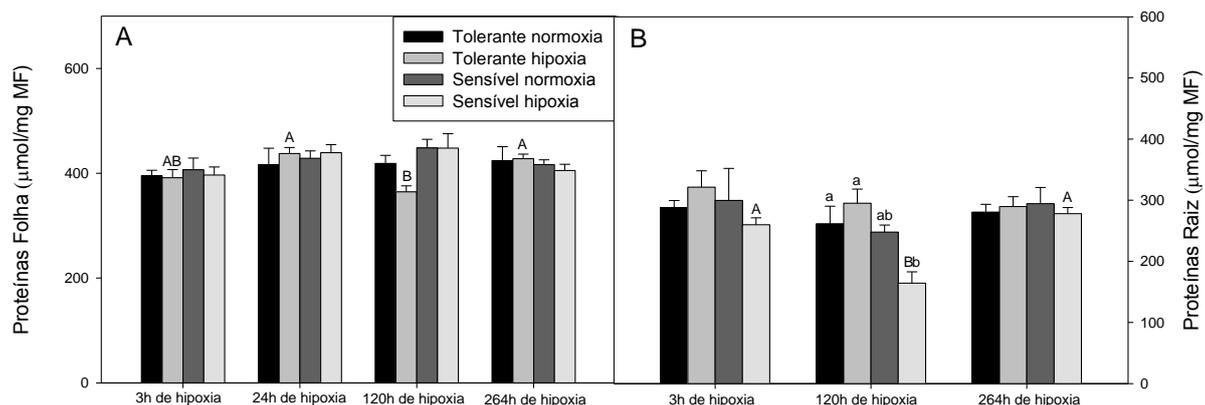
**Figura 2-** Determinação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e razão clorofila *a/b* (D). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.1.3. Determinação de proteínas totais

Em relação ao conteúdo de proteínas totais nas folhas observa-se que não há diferenças entre os tratamentos nas diversas horas de estresse avaliadas. No entanto, nota-se que o clone tolerante em hipoxia ao longo do tempo das análises apresenta menor teor de proteína com 120 horas de estresse, conseguindo-se, no entanto, recuperar-se como é visto na análise feita em 264 horas de estresse (Figura 3A).

De modo interessante, na raiz ocorreram diferenças com 120 horas de estresse destacando-se altos valores para o clone tolerante em condições normais e submetidas à hipoxia e decréscimos para o clone sensível em hipoxia. Avaliando os três dias de coleta, observa-se menor valor no conteúdo de proteína com 120 horas de estresse e

assim como nas folhas, o teor é recuperado com 264 horas de hipoxia (Figura 3B). Coletivamente, esses resultados indicam uma manutenção do aparato protéico durante condições de estresse por hipoxia e que possivelmente ajustes específicos na concentração de proteínas particulares estejam a ocorrer garantindo a viabilidade das plantas nessas condições.

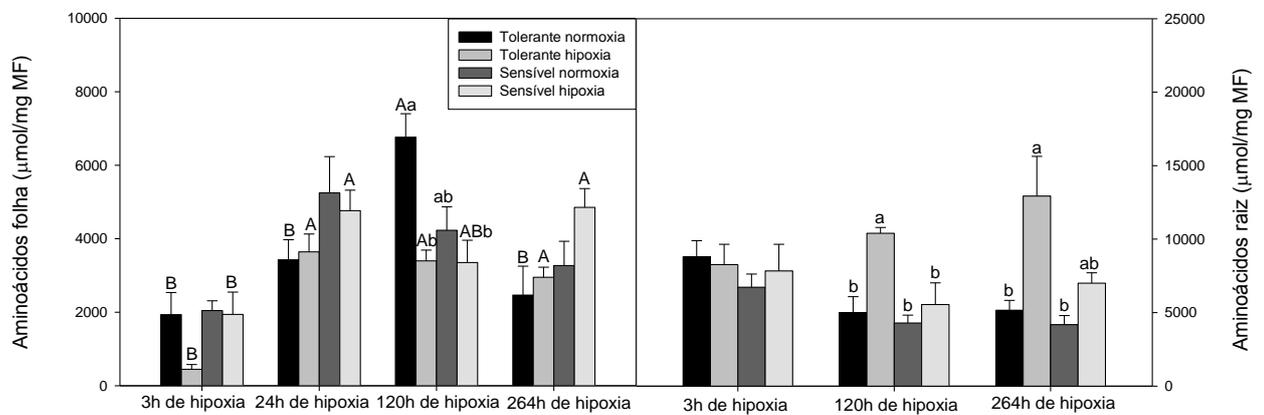


**Figura 3-** Determinação de proteínas solúveis totais em folha (A) e em raiz (B). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.1.4 Determinação de aminoácidos totais

A concentração de aminoácidos totais presentes nas folhas diferiram após 120 horas de hipoxia e de forma interessante, os clones sob hipoxia apresentaram menores concentrações do que os seus respectivos controles. Nota-se também que ao longo do tempo há um acúmulo de aminoácido nas folhas tanto para o clone tolerante quanto para o clone sensível (Figura 4A).

Nas raízes é possível observar que com 120 horas e 264 horas de hipoxia há um acúmulo significativo de aminoácido no clone tolerante em condição de estresse o que não é notado nos demais tratamentos (Figura 4B).

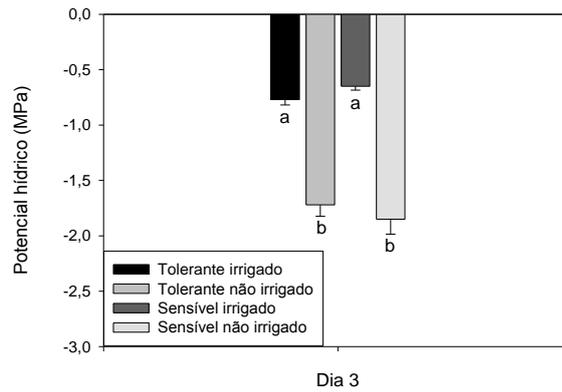


**Figura 4-** Determinação de aminoácidos totais em folha (A) e em raiz (B). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

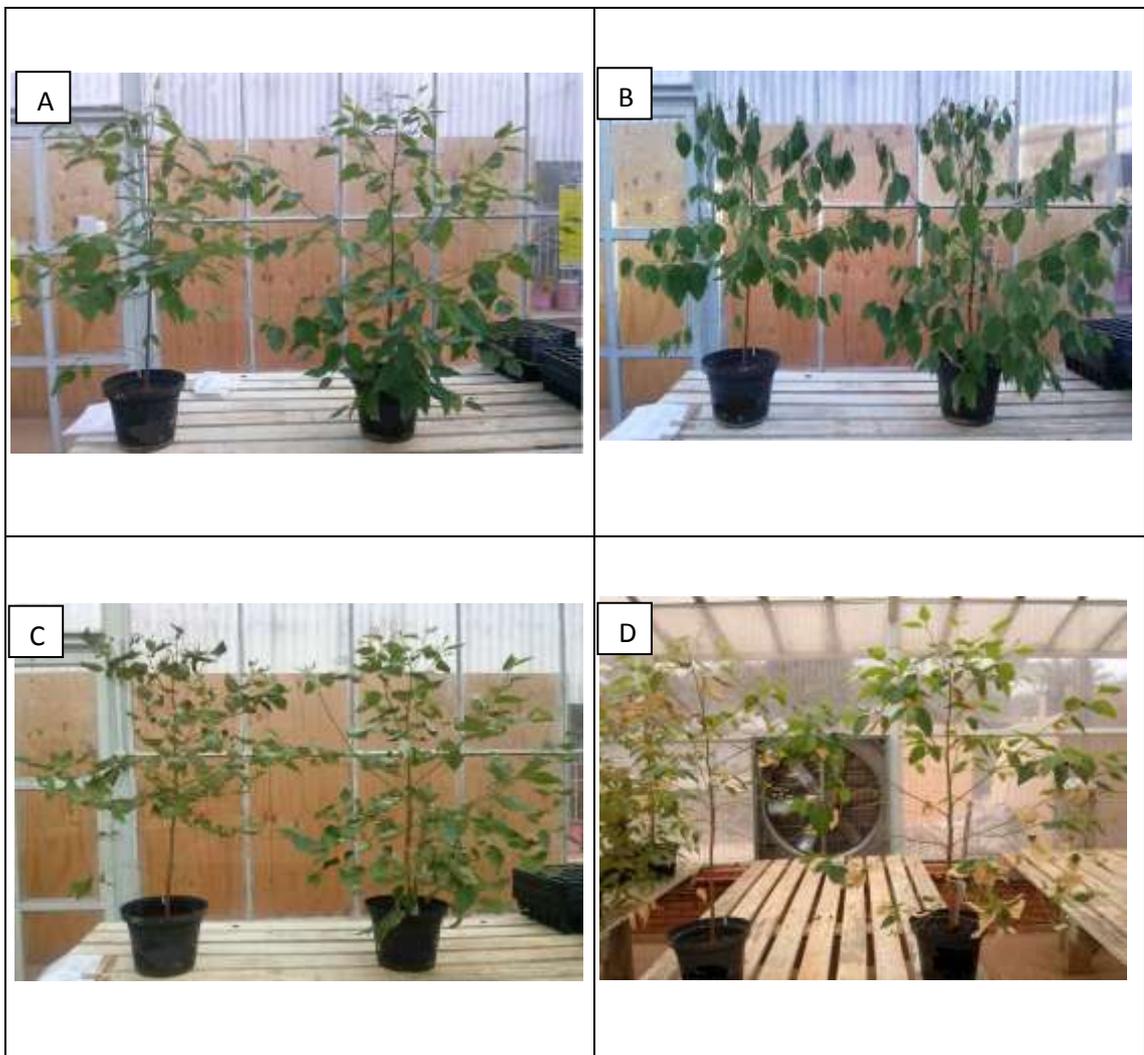
## 4.2. Experimento de Déficit hídrico

### 4.2.1. Determinação do potencial hídrico

A suspensão da irrigação foi feita após a primeira análise de trocas gasosas. Em seguida, foi acompanhado o potencial hídrico até as plantas alcançarem um potencial hídrico de aproximadamente  $-1,5$  MP, o qual foi atingido no terceiro dia de limitação hídrica (Figura 5A). Essa resposta relativamente rápida pode ser explicada, ao menos em parte, pelo volume do vaso em que as plantas foram cultivadas. Assim, em função da redução no potencial hídrico (Figura 5A) sintomas de déficit hídrico foram observados em ambos os clones (Figura 6A, 6B e 6C). Depois de feitas as coletas, as plantas foram reidratadas a fim de se verificar a recuperação do fenótipo (Figura 6D) e também os parâmetros de trocas gasosas, descritos abaixo.



**Figura 5-** Determinação do potencial hídrico no terceiro dia de estresse. Teste deTukey a 5% de probabilidade ( $P<0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n=$  seis repetições.

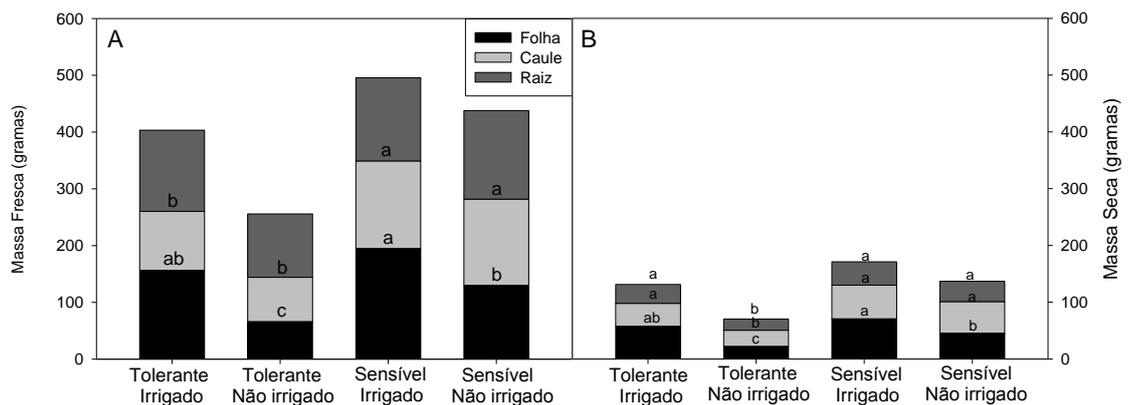


**Figura 6-** Fenótipos observados para os clones tolerante e sensível a seca de ponteiros, respectivamente, após 24 horas (A) e 72 horas (B) de déficit hídrico. Os mesmos clones após 24 horas (C) e trinta dias (D) de reidratação.

#### 4.2.2. Determinação de massa fresca e massa seca

Ao final do experimento as plantas foram separadas em folha, caule e raiz e suas massas mensuradas. Cumpre mencionar que em condições irrigadas ambos os clones tolerante e sensível apresentaram maiores valores de massa foliar; ademais, o clone tolerante em condições não irrigadas sofreu decréscimo na massa foliar, o que pode ser justificado, ao menos em parte, pela utilização dessa massa para garantir a maior tolerância observada nesse clone. Em relação à massa do caule, maiores massas foram observadas no clone sensível tanto em condições irrigado e não irrigado e o oposto foi observado para o clone tolerante em ambas as condições. De forma interessante, não se verificaram diferenças significativas na massa do sistema radicular (Figura 7A).

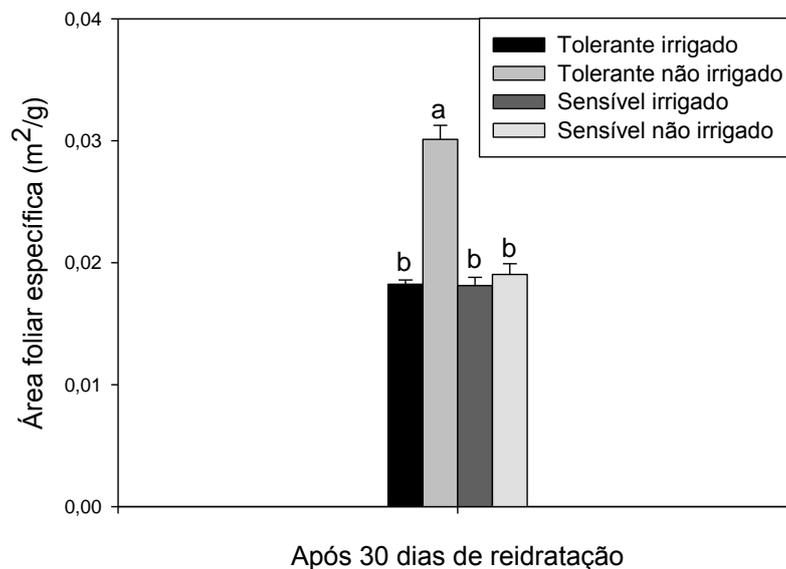
A massa seca das folhas foi maior nos clones tolerante e sensível sob condições irrigadas. Em adição, houve diminuição na massa seca de folhas no clone sensível não irrigado, redução essa ainda maior no clone tolerante submetido à mesma condição. A massa do caule foi maior no clone sensível em ambos os tratamentos sendo ainda menor no clone tolerante não irrigado. A massa do sistema radicular foi menor no clone tolerante não irrigado que pode ser parcialmente explicado pela destruição de raízes grossas e investimento em raízes finas, que são mais complicadas de serem isoladas, e que contribuem mais efetivamente para a absorção de água (Figura 7B).



**Figura 7-** Determinação de matéria fresca (A) e matéria seca (B). Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.3. Determinação da área foliar específica

Conforme já descrito, ao final do experimento foi determinada a área foliar específica (AFE), que trata-se de uma medida interessante para compreender os processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento das plantas ao permitir a observação da possível alocação diferencial da biomassa foliar por uma determinada unidade de área (POORTER & GARNIER, 1999, citado por SCALON & FRANCO, 2007). Dessa forma, pode-se notar que o clone tolerante não irrigado apresentou uma maior AFE em relação aos outros tratamentos (Figura 8) após 30 dias de reidratação. Nota-se também que a limitação hídrica pouco ou nada influenciou a AFE no clone sensível.



**Figura 8-** Determinação da área foliar específica (A). Teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.4. Determinação de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

A deficiência de água no solo compromete diversas funções nas plantas refletindo-se diretamente nos parâmetros de trocas gasosas. A fim de melhor compreender esse efeito, a análise de assimilação de  $\text{CO}_2$  foi feita antes do estresse, no ponto de  $-1,5$  MPa

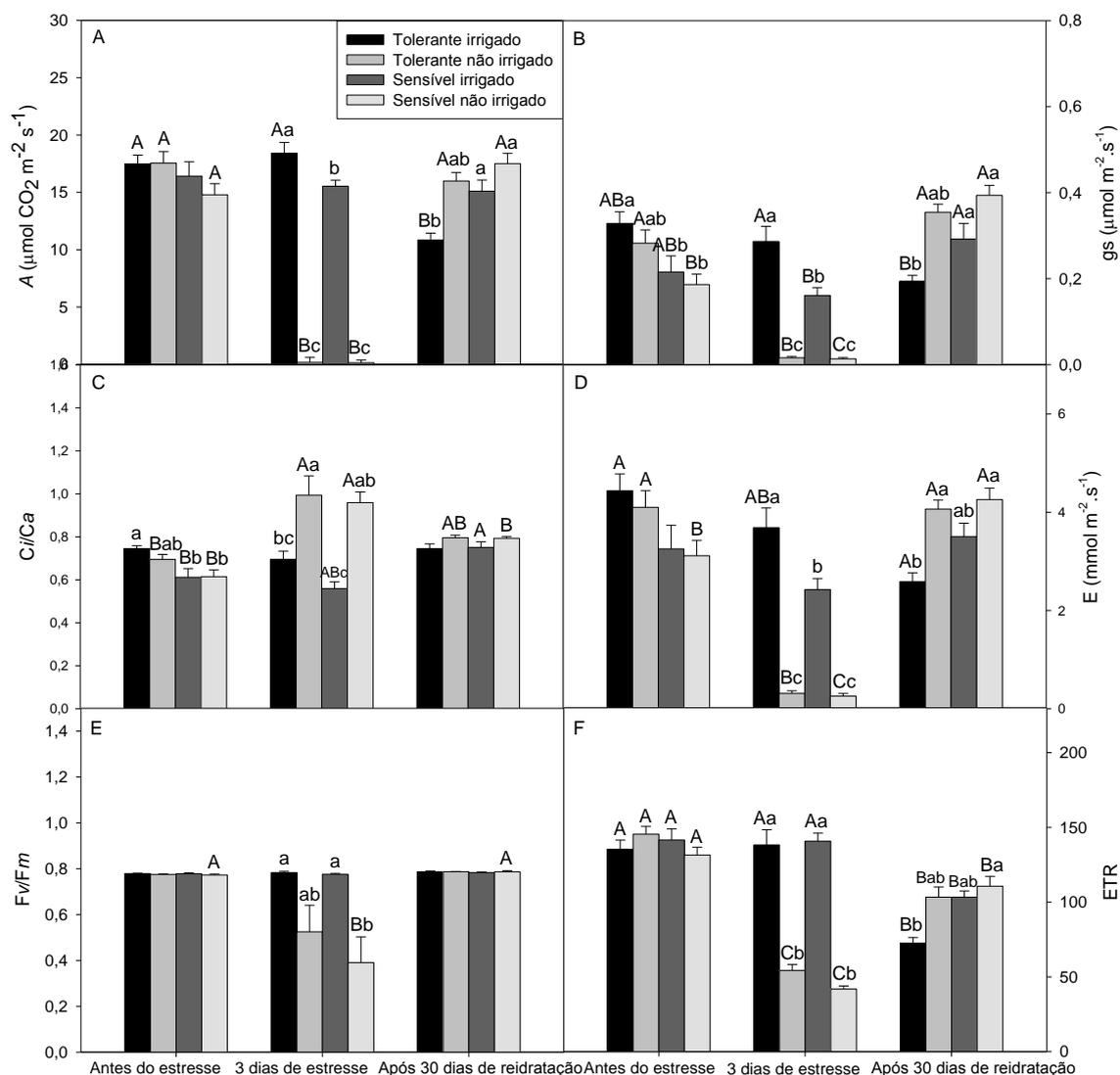
e após trinta dias de reidratação. Pode-se observar que na ausência de limitação hídrica (primeira medição) não foram observadas mudanças significativas nos tratamentos previamente definidos, indicando que os clones apresentam a mesma taxa fotossintética. Após atingirem o potencial hídrico desejado notou-se uma queda brusca da fotossíntese em ambos os clones não irrigados. Depois da reidratação, os clones tolerante e sensível não irrigados recuperaram à taxa fotossintética observada antes da imposição do estresse e de forma interessante, sobressaíram em relação aos seus controles apresentando maiores  $A$  após o trigésimo dia e ao longo do tempo (Figura 9A).

No que se refere à condutância estomática ( $g_s$ ) observa-se uma menor  $g_s$  no clone sensível antes da imposição do tratamento. Com a imposição do estresse, ocorreu um decréscimo em  $g_s$  nos clones em condições não irrigadas, o que justificaria, ao menos parcialmente, as menores taxas fotossintéticas observadas. Como observado para as taxas fotossintéticas, os clones utilizados apresentaram aumentos em  $g_s$ , sobressaindo em comparação a seus respectivos controles e ao longo das análises (Figura 9B).

Como já anteriormente dito, a razão entre a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e concentração externa ( $C_a$ ) é um parâmetro que pode indicar possíveis limitações difusivas e bioquímicas na assimilação de  $\text{CO}_2$ . Evidencia-se aqui que antes da imposição do estresse, menor relação  $C_i/C_a$  foi observada no clone sensível. Com efeito, ao atingiram o potencial hídrico desejado ( $\Psi_w = -1,5$  Mpa), ambos os clones, em condições não irrigadas, apresentaram uma maior razão  $C_i/C_a$ , o que sugere que nessa condição a ocorrência de limitações bioquímicas à assimilação de  $\text{CO}_2$ . Após trinta dias de reidratação estas plantas equilibraram com os valores dos controles, mostrando uma total recuperação dessas plantas após o estresse. Cumpre mencionar que o clone sensível em ambas as condições apresentou aumentos significativos na razão  $C_i/C_a$  (Figura 9C).

Não se observaram diferenças significativas em relação à transpiração entre os clones antes do estresse embora uma tendência de menores valores no clone sensível sejam aparentes. Houve uma diminuição na transpiração em ambos os clones em condições de limitação hídrica, o que corrobora com as outras análises. Não obstante, os clones recuperaram sua taxa transpiratória após trinta dias de reidratação. Ao final das análises nota-se que os clones apresentam maiores valores quando comparados ao início das medições (Figura 9D).

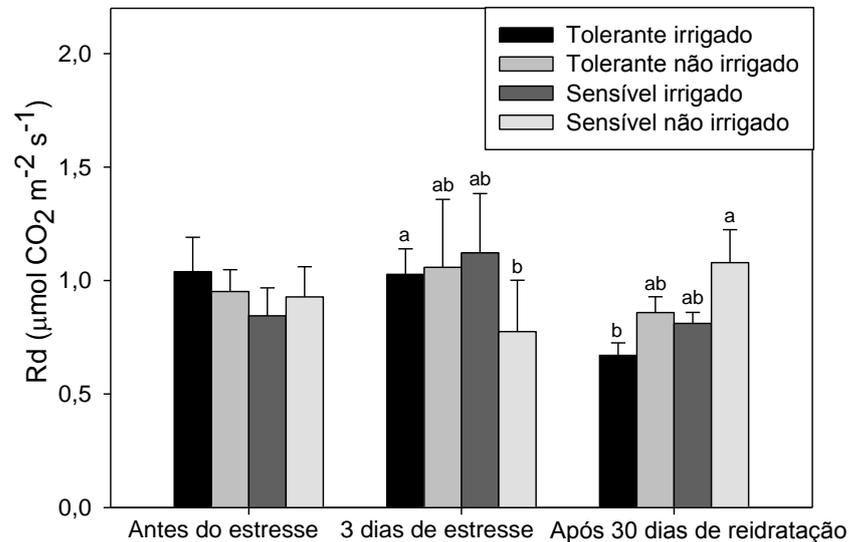
A razão  $F_v/F_m$ , que indica o rendimento quântico fotoquímico máximo do fotossistema II (PSII) (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987), encontrava-se, antes da imposição do estresse, em torno de valores considerados adequados a plantas na ausência de estresse (~0.83) e sem diferenças significativas entre clones. Após três dias de estresse, as plantas que sofreram limitação hídrica apresentaram queda na razão  $F_v/F_m$  sendo observados ainda valores menores no clone sensível, demonstrando uma maior sensibilidade do aparato fotoquímico nesse clone. Com efeito, após trinta dias de reidratação observou-se a completa recuperação desse parâmetro (Figura 9E) indicando que não há danos ao PSII e que a possível fotoinibição a fotossíntese seja dinâmica, possibilitando, portanto, a recuperação das taxas fotossintéticas, como observado. A taxa de transporte de elétrons (ETR) é similar entre clones antes da imposição do estresse. Contudo, ao atingir o potencial hídrico de -1,5MPa observaram-se decréscimos nos clones não irrigados. Trinta dias após a reidratação observou-se uma uniformidade nesse parâmetro, porém com valores relativamente menores em relação à medição realizada antes da imposição do estresse. Cabe ressaltar que ambos os clones (sensíveis e tolerantes) em condições não irrigadas, que anteriormente apresentaram menores valores, conseguiram alcançar o mesmo padrão que seus controles, indicando a completa recuperação após o estresse da taxa de transporte de elétrons (Figura 9F).



**Figura 9-** Parâmetros de trocas gasosas antes da imposição do estresse, três dias de estresse e após trinta dias de reidratação: fotossíntese (A), condutância estomática (B),  $C_i/C_a$  (C), transpiração (D), razão  $F_v/F_m$  (E) e ETR (F). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

A respiração no escuro em ambos os clones, sob condições normais, não apresentou diferença. Não obstante, no terceiro dia de estresse foram observados valores menores no clone sensível em condições não irrigadas. Diferenças nesse parâmetro foram também observadas trinta dias após a reidratação observando-se maiores taxas

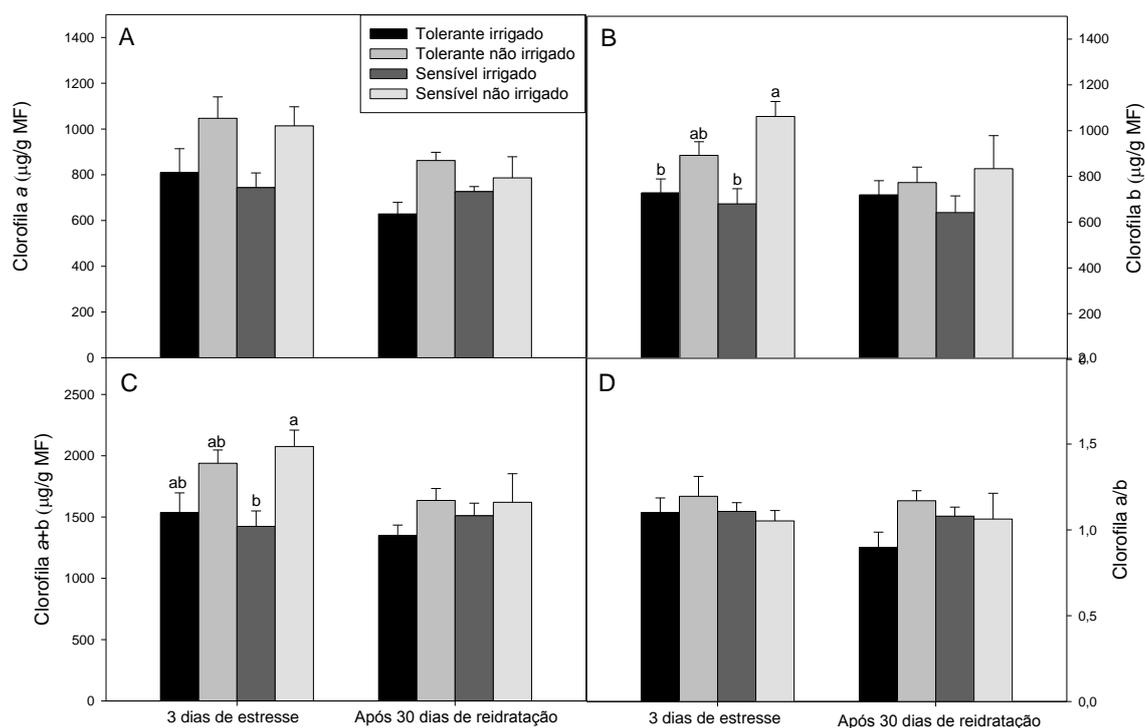
respiratórias em condições não irrigadas, aumento esse ainda maior no clone sensível não irrigado (Figura 9G).



**Figura 9-** Parâmetros de trocas gasosas antes da imposição do estresse, três dias de estresse e após trinta dias de reidratação: Respiração (G). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos

O teor de clorofila *a* não diferiu quando as plantas atingiram o potencial hídrico de -1,5 MPa bem como após reidratação (Figura 10A). Em relação ao teor de clorofila *b*, pode-se notar um aumento nos clones sob limitação hídrica comparativamente aos controles e que após trinta dias de reidratação obteve-se uma mesma tendência, embora não significativa. Como mencionado, com a re-irrigação não houve diferenças entre os tratamentos (Figura 10B). De modo interessante, os teores de clorofilas totais foram maiores nos clones sob condições não irrigadas. Não foram observadas diferença após reidratação (Figura 10C). Com efeito, a razão clorofila *a/b* não se alterou após três dias de estresse bem como após a reidratação, indicando a manutenção de um equilíbrio nos teores de clorofila *a* e *b*, mesmo durante a imposição do estresse (Figura 10D).



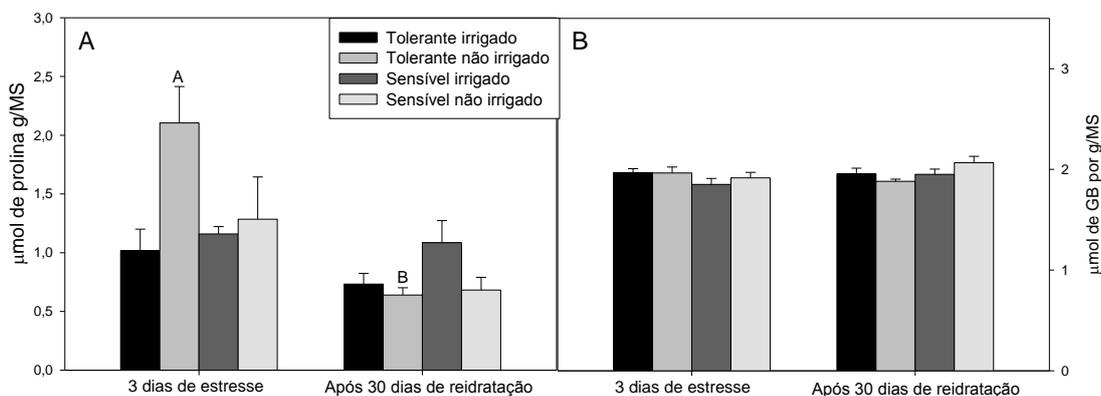
**Figura 10-** Determinação de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e razão clorofila *a/b* (D). Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.6. Determinação de prolina e glicina-betaína

A prolina, um aminoácido osmoprotetor cuja concentração é muito sensível a condições de estresse, normalmente se acumula em plantas sob condições de estresse, acúmulo esse que pode auxiliar na seleção de plantas mais tolerantes (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008). Cumpre mencionar que este aminoácido tem sido muito estudado no que se refere ao metabolismo de plantas sob condições de estresse (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008). Nesse contexto, a capacidade das plantas em acumular prolina durante a deficiência hídrica tem sido fortemente associada à tolerância em condições desfavoráveis (SAWAZAKI, 1981). De acordo com Hanson, 1980 citado por Nogueira *et al.* 2001, as plantas, antes de sofrerem com a imposição de um determinado estresse, possuem níveis de prolina variando de 1 a 5  $\mu\text{mol. g}^{-1}$  de matéria seca, como por

exemplo, arroz, milho, sorgo, cevada e trigo. Assim, observa-se que não há diferenças no acúmulo de prolina no terceiro dia de estresse, embora uma tendência de aumento no clone tolerante não irrigado seja observada, o que sugere um possível ajustamento osmótico. Ademais, trinta dias após a irrigação reduções nos teores de prolina foram observadas, indicando a recuperação dessas plantas e logicamente, a ausência de estresse. De maneira interessante, é possível notar uma queda brusca do clone tolerante não irrigado nos dois tempos de análise. Tomadas em conjunto, essas informações sugerem que esse aminoácido seja de fundamental importância para indicar o nível de estresse da planta, atuando como importante mediador do ajustamento osmótico em condições de estresse em materiais tolerantes (Figura 11A).

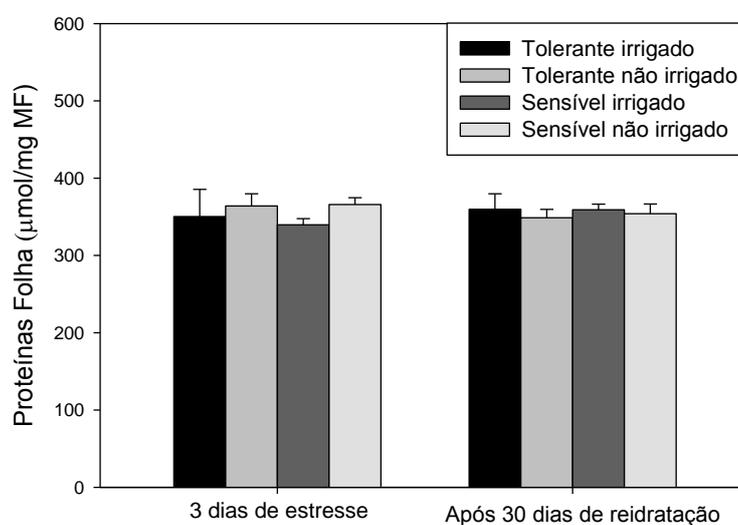
A glicina-betaína (GB) é um composto quaternário de amônio que atua regulando e protegendo a membrana do tilacóide a fim de evitar danos ao aparato fotossintético (ROBINSON E JONES, 1986 citado por ASHRAF E FOOLAD, 2007). É possível notar que não houveram diferenças significativas no acúmulo de GB mesmo em plantas com limitação hídrica (potencial hídrico de -1,5 MPa) e também após trinta dias de reidratação. Embora tenha atingido um potencial hídrico bastante significativo, uma justificativa para tal fato seria que o período foi curto para que ocorresse acúmulo desse aminoácido (Figura 11B).



**Figura 11-** Determinação de prolina (A) e glicina-betaína (B) nos clones de eucalipto. Letras minúsculas comparam os tratamentos no mesmo tempo. Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.7. Determinação de proteínas totais

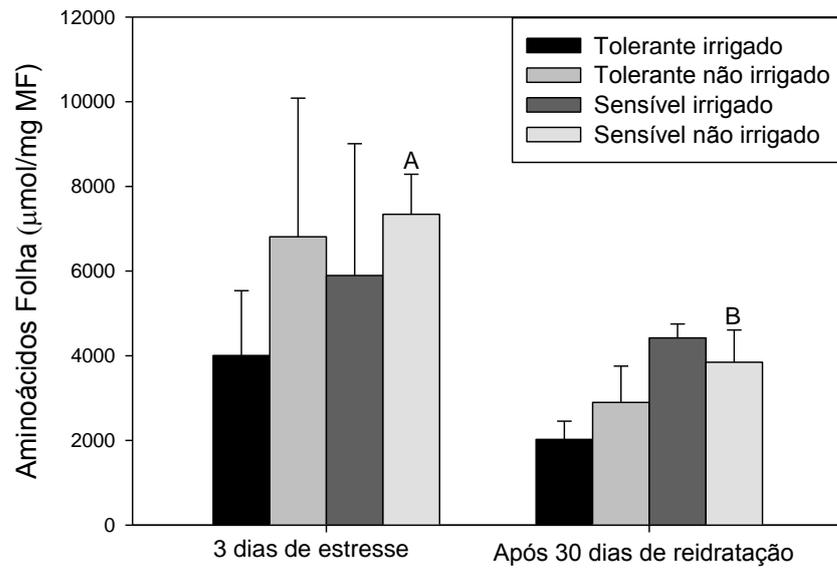
Não foram observadas alterações significativas no conteúdo de proteína no terceiro dia de estresse, embora haja uma tendência de aumento nos clones não irrigados. Do mesmo modo, após trinta dias de reidratação não foi observado incrementos nesse parâmetro (Figura 12).



**Figura 12-** Determinação de proteínas solúveis totais em folha. Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

#### 4.2.8. Determinação de aminoácidos totais

O conteúdo de aminoácidos totais não foi alterado quando as plantas atingiram o potencial hídrico  $-1,5\text{MPa}$ , embora seja notada uma tendência de maiores valores nas plantas não irrigadas. Do mesmo modo, não foi notada modificações após trinta dias de reidratação. Contudo, ao longo do tempo observa-se quedas nos teores de aminoácidos no clone sensível sob condições não irrigadas (Figura 13).



**Figura 13-** Determinação de aminoácidos totais em folha. Letras minúsculas denotam diferenças estatísticas quando se comparam os tratamentos no mesmo dia de avaliação e maiúsculas quando se comparam os mesmos tratamentos ao longo do tempo de análises pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  DP (desvio padrão).  $n =$  seis repetições.

## DISCUSSÃO

### *5.1 . Experimento de Hipoxia*

O acúmulo de água no solo, reduzindo a disponibilidade efetiva de oxigênio, leva a um declínio rápido em  $A_N$  tanto em espécies de angiospermas como em gimnospermas (KOZLOWSKI, 1997). Não obstante, essa redução não foi, a princípio, observada nesse trabalho o que poderia, ao menos em parte, ser justificado pelo curto período de hipoxia. Aquele mesmo autor salienta que a queda em  $A_N$  no início do estresse estaria fortemente associada ao fechamento estomático, mas com o decorrer do alagamento, essa queda poderia estar mais diretamente associada à inibição no processo fotossintético. Para tanto, alterações a nível enzimático de carboxilação e também a perdas de clorofila parecem ser preponderantes. No entanto, na planície inundada da Amazônia, espécies arbóreas tolerantes a esse fenômeno conseguem recuperar  $A_N$  podendo até mesmo aumentá-la após longos períodos de hipoxia. Com isso, pode-se observar que, associado a essa resposta fotossintética, alterações anatômicas, incluindo a formação de raízes adventícias e o aparecimento de lenticelas (HERRERA, 2013 citado por

(KREUZWIESER E RENNENBERG, 2014). Em carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H. E. Moore) foi observado que o alagamento do solo diminuiu  $A_N$  e também a condutância estomática (ARRUDA E CALBO, 2003). Em cacão (*Theobroma cacao* L.), o alagamento do solo provocou diminuição da abertura estomática e também da taxa fotossintética em condições de luz saturante (REHEM, 2006).

Em relação ao teor de pigmentos foi estudado o efeito da inundação parcial e total em *Setaria anceps* e *Paspalum repense* notou-se que as plantas totalmente submersas apresentaram um reduzido valor no teor de clorofila total já no início da inundação, sendo esta mais pronunciada na primeira espécie (ISHIDA *et al.* 2002). Ao avaliar o efeito da hipoxia em espécies de carvalho (*Quercus* spp.), Wagner & Dreyer, 1997 observaram uma significativa redução no teor de clorofilas, bem como queda na fotossíntese e condutância estomática. A mesma queda no teor de clorofila nessas condições foi obtida em experimentos com pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) (CARVALHO & ISHIDA, 2002).

Em raízes de soja foi observado que nos primeiros três dias de deficiência de oxigênio houve um aumento da síntese de proteínas totais, acompanhada de uma queda aos seis dias e obtendo teores maiores que o controle nos outros dias de condução do experimento (BADINELLI, 2008). Em milho submetido ao alagamento é notada uma maior concentração de proteínas solúveis totais tanto em folhas como em raízes (SILVA, 2012).

Como já mencionado, não houve alteração significativa no teor de proteínas no presente trabalho, o que pode ser devido ao período curto de estresse. Com efeito, o pequeno impacto da redução na concentração de oxigênio observado nesse trabalho em parâmetros de trocas gasosas e fotoquímicos, associados à manutenção dos níveis de pigmentos e de proteínas totais, com alterações nos níveis de aminoácidos totais, tanto em folhas quanto em raízes, indicam que possivelmente uma reprogramação metabólica, na tentativa de manutenção da disponibilidade energética, ocorra em resposta a essa limitação na disponibilidade de oxigênio em Eucalipto, independente do clone avaliado.

Ademais, como a tolerância observada em condições de campo não foi efetivamente observada nesse trabalho, sugere também que a ocorrência da seca de ponteiros seja um evento climático complexo, que envolva ciclos de umedecimento (hipoxia) e secagem (limitação hídrica), o que dificulta grandemente a sua simulação

em condições experimentais. Não obstante, estudos futuros devem se concentrar na identificação de aspectos metabólicos que acontecem em Eucalipto em resposta a essa manipulação na concentração de oxigênio.

## **5.2. Experimento de Déficit hídrico**

A deficiência hídrica promove alterações significativas em parâmetros de crescimento (acúmulo de matéria seca e fresca) em ambos os clones. Do mesmo modo, o déficit hídrico rigoroso em *Melaleuca alternifolia* Cheel ocasionou a redução do crescimento, produção de matéria fresca e seca e o conteúdo de óleo essencial (SILVA *et al.*, 2002). Em relação à área foliar específica, notou-se que o clone tolerante não irrigado apresentou uma maior AFE em relação aos outros tratamentos (Figura 8) após 30 dias de reidratação. Embora seja notado esse incremento, em trabalho feito com nim-indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) sob diferentes regimes hídricos o mesmo resultado não foi encontrado em relação à razão de área foliar e área foliar específica mesmo havendo diferença na área foliar (MARTINS *et al.* 2010). Em estudos com mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes níveis de água no solo, também foi encontrado resultado semelhante a este último trabalho (NASCIMENTO *et al.* 2011). Assim, a resposta diferencial observada em clones de Eucalipto assumidamente tolerante ao déficit hídrico indica mecanismos específicos nessa espécie.

As plantas ao atingirem o potencial hídrico desejado tiveram uma queda brusca da fotossíntese em ambos os clones não irrigados e também uma queda no clone sensível irrigado. Clones de eucalipto quando submetidos à deficiência hídrica também apresentaram um declínio da fotossíntese quando comparadas as plantas irrigadas bem como condutância estomática e transpiração (TATAGIBA, 2008). Depois de reidratados, os clones tolerantes e sensíveis não irrigados retomaram à sua taxa fotossintética (Figura 9A). Tatagiba 2008 ao avaliar as relações hídricas na seleção precoce de clones de eucalipto, observou que após reidratação os clones recuperaram sua taxa fotossintética, fazendo com que não existissem mais diferenças entre as plantas anteriormente submetidas ao déficit hídrico e aquelas que foram mantidas irrigadas.

Chaves *et al.* 2004 avaliando em seu trabalho a “Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada no solo” não notou diferença na condutância estomática nos tratamentos com deficiência hídrica e naqueles com manutenção da irrigação. No presente trabalho, uma justificativa para esse declínio em  $g_s$  seria o nível de estresse em que essas plantas se encontravam, e com isso uma tentativa de não perder água seria manter os estômatos fechados, ocasionando uma limitação estomática à fotossíntese. Com efeito, limitações bioquímicas também parecem ter ocorrido em função das alterações observadas na razão  $Ci/Ca$ , com pouco ou nenhum impacto sobre as funções fotoquímicas em clones de Eucalipto.

O teor de clorofila total foi maior no clone sensível não irrigado e no clone tolerante na mesma condição (Figura 10C). Em experimento com mudas de Eucalipto “urograndis” sensível e *E. camaldulensis* x *E. grandis*, tolerante ao déficit hídrico, foi observado que a interação entre genótipo x regime hídrico x tempo no décimo quinto dia o regime hídrico afetou o clone sensível não irrigado havendo um decréscimo da clorofila total nesse ponto ao passo que o clone tolerante apresentou valores elevados no sexto dia de deficiência hídrica (SILVA, 2014). Silva 2004 trabalhando com *Eucalyptus grandis* verificou que as mudas com maior grau de estresse por deficiência de água e maiores doses de potássio apresentaram maior teor de clorofila. Resultados semelhantes foram obtidos nesse trabalho para os clones tolerante e sensível sob condições não irrigadas.

O acúmulo de prolina é importante para determinar o grau de estresse em que as plantas se encontram. Ferreira 2002 ao trabalhar com genótipos de milho avaliando o metabolismo do nitrogênio associado ao déficit hídrico notou que a quantidade de prolina aumentou devido à deficiência hídrica, e ao recuperar-se do estresse atingiu níveis normais. Plantas de *Hedyosmum brasiliense* submetidas à restrição hídrica obtiveram incrementos na concentração de prolina nas folhas (MACHADO, 2004). Nesse contexto, o estudo dos níveis de prolina, justificando um possível ajuste osmótico, durante limitações hídricas parece de fundamental importância. Da mesma forma que a prolina, outro composto que é acumulado em condição de estresse é a glicina-betaína. Em trabalho com paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), foi possível observar que o déficit hídrico levou a incrementos no teor de glicina-betaína (PALHETA *et al.* 2010). Em mogno-africano (*Khaya ivorensis*), a deficiência hídrica

não alterou significativamente o conteúdo de GB. Contudo, houve um aumento no conteúdo de prolina na avaliação feita no dia 14 (ALBUQUERQUE, 2013). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que análises mais detalhadas do conteúdo de diversos aminoácidos podem auxiliar na identificação de compostos que venham a auxiliar no ajustamento osmótico em resposta a flutuações na disponibilidade hídrica.

Em relação ao teor de aminoácidos e proteínas, a graviola (*Annona muricata* L.), quando submetida à deficiência hídrica aumenta os teores de aminoácidos e há redução nas concentrações de proteínas em relação ao controle (OLIVEIRA, 2013).

## 6. CONCLUSÕES

Em síntese, os resultados obtidos indicam que os clones apresentam comportamento diferencial quando submetidos à hipoxia e ao déficit hídrico. Registre-se aqui que as pequenas diferenças observadas nos parâmetros de trocas gasosas em condições de hipoxia podem ser justificadas, ao menos parcialmente, pelo curto período de estresse. Saliente-se também que, ao menos de forma preliminar, os resultados obtidos indicam que o clone sensível sobressaiu nessas condições e que o clone tolerante, sob deficiência de oxigênio, obteve incrementos, talvez em uma tentativa de manter o metabolismo, e que assim, estudos metabólicos mais detalhados possam auxiliar na identificação dos mecanismos responsáveis pela tolerância diferencial comumente observada em condições de campo.

Sob déficit hídrico, nota-se que ambos os clones são capazes de recuperar suas taxas fotossintéticas e ainda retomar seu crescimento com a observada recuperação de seu fenótipo. Com efeito, destaca-se também a superioridade do clone sensível nessa recuperação apresentando maiores taxas fotossintéticas, o que pode, a longo prazo e com ciclos de umedecimento e secagem, comprometer a viabilidade desse material e justificando, ao menos parcialmente, a menor tolerância observada. Os teores de prolina e glicina-betaína obtidos remetem uma idéia do estresse sofrido pelas plantas, embora o

conteúdo per se não deva ser tomado como um indicativo isolado do estresse. Ademais, um possível ajustamento osmótico, no clone tolerante parece auxiliar, ao menos em parte, na manutenção de um status hídrico mais favorável, o que sustentaria a produção energética e a manutenção do crescimento em condições de campo, como comumente observado para esse material. Cumpre mencionar que a fim de se avaliar o comportamento desses clones frente a essas diversidades, estudos metabólicos e moleculares mais detalhados deverão ser realizados com o intuito de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na tolerância diferencial desses clones à Seca dos Ponteiros, tendo em vista a importância econômica dessa anomalia. Esses estudos deverão facilitar grandemente a identificação precoce de materiais mais tolerantes e potencialmente úteis em programas de melhoramento florestal.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico**. ABRAF 2013. Disponível em: [http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13\\_BR.pdf](http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF13/ABRAF13_BR.pdf). Acesso em: 04 de Novembro de 2013.

ALBUQUERQUE, M. P. F.; MORAES, F. K. C.; SANTOS, R. I. N.; CASTRO, G. L. S.; RAMOS, E. M. L. S.; PINHEIRO, H. A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas a deficit hídrico e reidratação. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.48, n.1, p.9-16, jan. 2013.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F.; **Clonagem e doenças do eucalipto** 2<sup>a</sup> ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004.

ALMEIDA, A. Q.; RIBEIRO, A.; LEITE, F.P. **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, p. 005-013, 2013.

ALVAREZ, V.H. **Equilíbrio de formas disponíveis de fósforo e enxofre em dois latossolos de Minas Gerais**. 1974. 125p. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1974.

ARRUDA, G. M.; CALBO, M. E. R. Efeitos da inundação no crescimento, trocas gasosas e porosidade radicular da carnaúba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore). **Acta bot. bras.** 18(2): 219-224,2003.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany** 59. 206–216, 2007.

BADINELLI, P. G. **Respostas Bioquímicas e Fisiológicas de Plantas Noduladas De Soja submetidas à Hipoxia**. 2008. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2008.

BATES, L. S.; WALDERN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, The Hague, v. 39, p. 205-07, 1973.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Plant** 170, 1987.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254, 1976.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2, p.48-54, 1997.

CARVALHO, C. J. R. & ISHIDA, F. Y. Respostas de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) jovens ao alagamento. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 37, n. 9, p. 1231-1237, 2002.

CHAVES, J. H.; REIS, G. G.; REIS, M. G. F.; NEVES, J. C. L.; PEZZOPANES, J. E. M.; POLLI, H. Q. Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo: relações hídricas de plantas em tubetes. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.28, n.3, p. 333-341, 2004.

CLARK, R.B. Characterization of phosphates in intact maize root. **J. Agric. Food Chem.**, 23:458-460, 1975.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Levantamento generalizado e semidetalhado de solos da Aracruz Celulose S. A. no Estado do Espírito Santo e no extremo sul do Estado da Bahia e sua aplicação aos plantios de eucalipto/ Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rio de Janeiro, 2000.

FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. Stomatal conductance and photosynthesis. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 33, p. 317-345, 1982.

FERNANDES, E.T. **Fotossíntese e crescimento inicial de clones de eucalipto sob diferentes regimes hídricos**. 2012. 114p. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, 2012.

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

FERREIRA, F. A. & MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil**. Mogi Guaçu: Universidade Federal de Viçosa/International Paper, 98 p, 2002.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRA, L. E. M.,; PURCIN, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, 2002.

GREIVE, C.M. AND GRATTAN, S.R. Rapid assay for determination of water-soluble quaternary amino compounds. **Plant Soil**, 70: 303-307, 1983.

ISHIDA, F.Y.; OLIVEIRA, L.E.M.; CARVALHO, C.J.R.; ALVES, J.D. Efeitos da inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.6, p.1152-1159, 2002.

KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree physiolog monogr.** 1. Heron Pub, Victoria, Canada, 29p, 1997.

KREUZWIESER, J. AND RENNENBERG, H. Molecular and physiological responses of trees to waterlogging stress. **Plant, Cell & Environment**, 37: 2245–2259. doi: 10.1111/pce.12310. 2014.

MACHADO, A. V. **Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* mart. (chloranthaceae)**. 2004. Dissertação Mestrado. Universidade federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2004.

MARTINS, M. O.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; NETO, A. D. A.; SANTOS, M. G. Crescimento de plantas jovens de nim-indiano (*Azadirachta indica* A. Juss. - MELIACEAE) sob diferentes regimes hídricos. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.34, n.5, p.771-779, 2010.

NASCIMENTO, H. H. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; SILVA, E. C.; SILVA, M. A. Análise do crescimento de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes níveis de água no solo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.3, Edição Especial, p.617-626, 2011.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; NETO, E. B. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, 13(1):75-87, 2001.

OLIVEIRA, L. M.; SILVA, J. N.; COELHO, C. C. R.; NEVES, M. G.; SILVA, T. L.; NETO, C. F. O. Pigmentos fotossintetizantes, aminoácidos e proteínas em plantas jovens de graviola submetida ao déficit hídrico. **Agroecossistemas**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2013.

PACHECO, A.C. Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). Tese Doutorado. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2007.

PALHETA, E. C. V.; MELO, E. C.; SILVA, R. T. L.; ANDRADE, D. P.; MOTA, J. A.; NETO, C. F. O. Teores de Sacarose e glicina-betaína em Folhas de Paricá Submetida ao Estresse Hídrico. **62ª Reunião Anual da SBPC**, 2010.

PORRA, R.; THOMPSON, W.; KRIEDEMANN, P. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochim Biophys Acta** 975: 384-394, 1989.

REHEM, B. C. **Respostas fisiológicas de clones de *Theobroma cacao* L. ao alagamento do substrato**. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2006.

ROCHA, M.; LICAUSI, F.; ARAUJO, W.L.; NUNES-NES, A.; SODEK, L.; FERNIE, A.R. & van DONGEN, J.T. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by water logging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiol.**, 152:1501-1513, 2010.

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; ALMEIDA, L. D’A. Variação do teor de prolina em folhas de feijão em função da disponibilidade de água no solo. **Revista Científica do Instituto Agrônomo**, v. 40, nº 5, 1981.

SCALON, M. C.; FRANCO, A. C. Influência dos fatores ambientais na área foliar específica de espécies lenhosas do Cerrado. **Anais** do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG, 2007.

SIENKIEWICZ-PORZUCEK, A.; NUNES-NESE, A.; SULPICE, R., LISEC, J.; CENTENO, D. C.; CARILLO, P.; LEISSE, A.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A. R. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth. **Plant Physiol** 147: 115-127, 2008.

SILVA, I. M. A.; SANTOS, C. C. P. M.; SOUZA, M. W. R.; GONÇALVES, J. F.; LAIA, M. L. Teor de clorofila de clones de *Eucalyptus spp.* Sob déficit hídrico. **3º Encontro Brasileiro de Silvicultura**, 2014.

SILVA, J. N.; COELHO, C. C. R.; NEVES, M. G.; SILVA, J. E. S.; NETO, C. F. O. Ajustadores osmóticos e compostos nitrogenados em plantas de milho (*Zea mays*) submetidas ao alagamento. **Anais** do 10º Seminário Anual de Iniciação Científica da UFRA, 2012.

SILVA, M. R.; KLAR, A. E.; PASSOS, J. R. Efeitos do manejo hídrico e da aplicação de potássio nas características morfofisiológicas de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (Hill ex. Maiden). **Irriga**, v. 9, n. 1, 2004.

SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L.C.A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: **Artmed**, 2004.

TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M.; REIS, E. F. Relações hídricas e trocas gasosas na seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com diferenciada disponibilidade de água no solo. *Floresta*, Curitiba, PR, v. 38, n. 2, 2008.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **Springer-Verlag**, 2008.

WAGNER, P. A.; DREYER, E. Interactive effects of water logging and irradiance on the photosynthetic performance of seedlings from three oak species displaying different sensitivities (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. rubra*). **Annales des Sciences Forestieres**, Versailles, v. 54, n. 5, p. 409-429, 1997.

WAUGH, D.L. & FITTS, J.M. Estudos de interpretação de análise de solo: Laboratório y macetas. Proyecto Internacional de Analisis de Suelo, por La Estacion Experimental Agrícola de la Universidade de Carolina del Norte. Washington, 36p. (**Boletim Técnico** n-3), 1966.

