



FARLEY SILVA SANTANA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO HÍBRIDO
Eucalyptus urophylla x *Eucalyptus camaldulensis* SUBMETIDOS
AO DÉFICIT HÍDRICO**

**LAVRAS-MG
2019**

FARLEY SILVA SANTANA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO HÍBRIDO *Eucalyptus urophylla* x
Eucalyptus camaldulensis SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santana, Farley Silva.

Aspectos fisiológicos e bioquímicos do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* submetidos ao déficit hídrico
/ Farley Silva Santana. - 2019.

107 p. : il.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Silvicultura. 2. Eucalipto. 3. Estresse abiótico. I. Paiva,
Luciano Vilela. II. Título.

FARLEY SILVA SANTANA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DO HÍBRIDO *Eucalyptus urophylla* x
Eucalyptus camaldulensis SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO**

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE HIBRID *Eucalyptus*
urophylla x *Eucalyptus camaldulensis* SUBMITTED TO THE WATER DEFICIT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de abril de 2019.

Dr. Breno Régis Santos	UNIFAL
Dr. Gilvano Ebling Brondani	UFLA
Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori	UFLA
Dr ^a . Vania Aparecida Silva	EPAMIG

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

*Aos meus pais,
por não mediram esforços para
tornar meu sonho em realidade.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Certamente, os parágrafos a seguir não atenderão todas as pessoas que contribuíram para a concretização dessa etapa tão importante em minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas fiquem certas da minha gratidão.

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a vida, me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e por iluminar minha caminhada.

Aos meus pais Aurelino e Vera Lúcia, pelo apoio, confiança, amor, carinho, e por todos os ensinamentos e exemplos transmitidos ao longo da vida.

À minha irmã Francielle, pelo companheirismo, carinho, confiança e exemplo de determinação e inspiração.

Com um carinho todo especial aos meus avôs, Pedro Pereira da Silva (*in memoriam*), Benício José de Santana (*in memoriam*) e Julia Vieira da Silva, pelos ensinamentos e sabedoria compartilhada.

A toda a minha família, pela confiança e carinho a mim dedicado.

Ao Prof^º. Dr. Luciano Vilela Paiva, pela orientação, apoio, amizade e desafios propostos.

A todos os colegas, amigos e funcionários do Laboratório Central de Biologia Molecular, em especial ao Douglas Barduche, Gabriela Nogueira, Flávia Baleeiro, Wesley Pires, Renan Pinto, Nathália Chagas, Ricardo Felipe, Fabrício Lelis e Mariele Rossato.

Agradecimento especial ao Thiago Bergamo e à Kamila Oliveira, por encararem junto comigo a condução dos experimentos.

A todos os professores da Universidade Federal de Lavras que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento profissional e pessoal. Em especial, aos professores Paulo Marchiori e João Paulo, pelas orientações sempre que necessário.

À Prof^ª Dr^a Ana Maria Mapeli, por todas as vezes que me incentivou, me fazendo acreditar em minha capacidade e ver a vida sempre pelo lado bom, sem dúvida uma das maiores incentivadoras e, portanto, corresponsável por eu ter chegado até aqui.

À pesquisadora da EPAMIG, Vania Aparecida Silva, por aceitar o convite de participação nesta banca examinadora.

Aos professores Breno Régis, Gilvano Brondani e Paulo Marchiori, por aceitarem o convite de participação nesta banca examinadora.

À CAPES, pela concessão da bolsa, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização desse trabalho.

Aos meus amigos Rezanio Carvalho, Rafael Pozzi, Manoel Linhares e Leonardo Brito, pela amizade, companheirismo, e muitas vezes, pelos sermões.

Aos amigos de curso, por me transmitirem sabedoria, força e persistência.

Enfim, obrigado a todos aqueles que contribuíram para a conclusão de mais essa etapa.

Após concluir essa parte do trabalho, a última que eu parei para escrever, acabo de descobrir o enorme prazer e privilégio de lembrar do quanto existem pessoas boas e que nos querem bem, isso não tem preço.

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

Muito obrigado!

RESUMO

A seca se torna cada vez mais uma das maiores preocupações para o setor agrícola, visto que é um dos fatores que mais limita o crescimento e a produtividade das culturas. Na tentativa de melhor entender as respostas fisiológicas e bioquímicas do eucalipto submetido à condição de seca, almejou-se com esse trabalho, comparar dois genótipos, VM1 e VM5 do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* e identificar os principais pontos que contrastam em respostas ao estresse. Além disso, verificar se déficits hídricos recorrentes promovem alterações nas plantas, a ponto de deixá-las mais tolerantes quando forem expostas à condição de seca. Para tanto, foram realizados dois experimentos: no primeiro, a imposição do déficit hídrico aconteceu com a suspensão diária da irrigação em cada grupo de plantas, de forma que, ao final do sexto dia, se tinha plantas com estresse de um a seis dias, além de um tratamento testemunha (sempre irrigado) e outro para a resiliência. Durante o período de imposição do estresse, o potencial hídrico foliar reduziu gradativamente em todos os tratamentos, alcançando o mínimo de -2,7 MPa com seis dias de déficit hídrico. Para as variáveis de trocas gasosas observou-se que o VM5 apresentou valores maiores em todas elas. Quanto aos aspectos bioquímicos, foi verificada uma elevação na concentração de H₂O₂ e MDA com o aumento do déficit hídrico em ambos genótipos. Também não foi verificada diferenças entre os genótipos com relação às atividades das enzimas do complexo antioxidante, onde se observou pico de atividade no terceiro e quarto dia de déficit hídrico. O tratamento de resiliência apresentou boa recuperação com todas as suas variáveis, mostrando valores próximos ao controle, e o VM1 conseguiu recuperar mais rápido do que o VM5. Os dados mostram que quando se trata de tolerância ao déficit hídrico, o clone VM1 se mostra mais tolerante, reduzindo variáveis que confeririam maior acúmulo de biomassa e ativando antecipadamente os mecanismos de defesa. No segundo experimento, três grupos de plantas foram submetidas a três ciclos diferentes de déficit hídricos, um estresse semanal, dois estresses semanais e três estresses semanais, durante três semanas e, outros dois grupos foram mantidos sempre irrigados. Após esse período, as plantas foram transferidas para vasos de 3dm³ e a irrigação foi completamente suspensa. Nove dias após a suspensão completa da irrigação, as plantas, principalmente aquelas que não passaram pelos ciclos de estresse e aquelas que sofreram estresse uma vez por semana, se encontravam com sinais acentuados de murcha. Aquelas que passaram por dois e três ciclos de estresses semanais conseguiram manter o potencial hídrico próximo ao do controle. Quanto as variáveis que compõem as trocas gasosas, valores que indicam melhor condição de hidratação nas plantas, que passaram pelos ciclos de déficit hídrico, foram observados. Os conteúdos de H₂O₂ e MDA foram significativamente reduzidos em função da exposição anterior ao déficit hídrico. Os resultados obtidos demonstraram que plantas expostas a múltiplos ciclos de déficit hídrico se ajustam, potencializando os seus mecanismos de defesa, para responderem mais rápido e vigorosamente em uma futura situação de seca.

Palavras-chave: Silvicultura. Eucalipto. Complexo antioxidante. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Drought is one of the major concerns for the agricultural sector, as it is an environmental factor that greatly limits crop growth and productivity. Focused on better understand the physiological and biochemical responses of eucalyptus to drought conditions, two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid genotypes (VM1 and VM5) were compared in a sought to identify the major contrasts under drought stress, as well as verify if recurrent water deficits promote epigenetic changes capable of becoming the plants more tolerant upon next exposures to dry condition. The first experiment performed was based on the imposition of water deficit with daily suspension of irrigation in each group of plants. Upon sixth day plants previously undergone to different amount of days (one to six) of drought stress were obtained altogether with a control treatment (plants always irrigated) and another for resilience. During the stress period, leaf water potential decreased gradually in all treatments reaching a minimum of -2.7 MPa at sixth day of water deficit. The VM5 genotype presented the higher values for all gas exchange variables. Regarding the biochemical aspects, as higher was the water deficit greater the H₂O₂ and MDA concentrations in both genotypes. No differences were verified for antioxidant enzymes which displayed peak activity on the third and fourth day of water deficit. The resilience treatment recovered itself after stress imposition with values close to the control, whereas VM1 was able to recover faster than the VM5. According to the data, clone VM1 seems to be more tolerant because its variables responsible to confer accumulation of biomass are reduced in water deficit but also in reason of an earlier activation of defense mechanisms. In the second experiment three groups of plants were submitted to three different cycles of water deficit (one, two and three weekly stresses, respectively) during three weeks, and two other groups were always kept well irrigated. Afterwards, plants were transferred to 3 dm³ vessels and the irrigation was completely suspended. Nine days upon complete suspension of water supply, plants had already marked signs of wilting especially those that did not go through stress cycles and those who suffered stress once a week. The plants undergone to two and three cycles of weekly stresses kept their water potential close to the control. In general, gas exchange values indicating a better hydration condition were observed in plants undergone to early cycles of water deficit. The H₂O₂ and MDA contents were significantly reduced probably as a function of previous exposure to water stress. Results show that plants exposed to multiple cycles of water deficit adjust themselves biochemical and phisyologically, what boosts cellular defense mechanisms to respond faster and more vigorously in future drought situations.

Key words: Silviculture. Eucalyptus. Antioxidant complex. Abiotic stress.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Gênero <i>Eucalyptus</i>.....	14
2.2	Estresse ambiental.....	16
2.3	Déficit hídrico	16
2.4	Respostas da planta ao déficit hídrico	18
2.5	Ativação de mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.....	19
2.6	Memória do estresse	21
	REFERÊNCIAS	23
	CAPÍTULO 2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE <i>EUCALYPTUS</i> SPP SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO	28
1	INTRODUÇÃO	30
2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1	Obtenção do material vegetal.....	32
2.2	Indução do déficit hídrico	33
2.3	Coleta de dados.....	33
2.3.1	Potencial hídrico do solo	33
2.3.2	Potencial hídrico foliar	34
2.3.3	Trocas gasosas	34
2.3.4	Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm).....	35
2.3.5	Peróxido de hidrogênio	35
2.3.6	Peroxidação lipídica	35
2.3.7	Enzimas do complexo antioxidante.....	36
2.3.7.1	Dismutase do Superóxido (SOD)	36
2.3.7.2	Catalase (CAT).....	36
2.3.7.3	Redutase do Monodehidroascorbato (MDHAR).....	37
3	RESULTADOS.....	38
3.1	Porcentagem de água na folha e potencial hídrico foliar	39
3.2	Trocas gasosas	40

3.3	Análises bioquímicas	50
4	DISCUSSÃO.....	58
4.1	Condição hídrica do solo	58
4.2	Porcentagem de água nas folhas de potencial hídrico foliar.....	58
4.3	Trocas gasosas	59
4.4	Análises bioquímicas	62
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	CAPÍTULO 3 ACLIMATAÇÃO DE MUDAS DE EUCALIPTO À SECA POTENCIALIZADA PELA EXPOSIÇÃO PRÉVIA AO DÉFICIT HÍDRICO	72
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1	Material vegetal.....	76
2.2	Ciclos de estresse	76
2.3	Imposição do déficit hídrico.....	77
2.4.	Coleta de dados.....	78
2.4.1	Potencial hídrico foliar	78
2.4.2	Trocas gasosas	78
2.4.3	Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm).....	78
2.4.4	Peroxídeo de hidrogênio	79
2.4.5	Peroxidação lipídica	79
2.5	Enzimas do complexo antioxidante.....	79
2.5.1	Dismutase do Superóxido (SOD)	80
2.5.2	Catalase (CAT).....	80
2.5.3	Redutase do Monodeidroascorbato (MDHAR).....	80
3	RESULTADOS.....	81
3.1	Peso dos vasos e potencial hídrico.....	81
3.2	Trocas gasosas	82
3.3	Mortalidade das plantas.....	89
3.4	Análises bioquímicas	90
4	DISCUSSÃO.....	98
4.1	Peso dos vasos e potencial hídrico foliar.....	99
4.2	Trocas gasosas	99

4.3	Mortalidade das plantas.....	101
4.4	Análises bioquímicas	102
4	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	105

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Espécies florestais, assim como todas as plantas perenes e sésseis, desenvolveram ao longo da evolução mecanismos que lhes conferem adaptação para tolerar condições ambientais variáveis e muitas vezes estressantes (DODD *et al.*, 2005). Apesar dessas adaptações, o ciclo de vida útil dessas plantas não permite a elas adaptações genéticas rápidas às modificações ambientais, o que as tornam suscetíveis às mudanças climáticas (LINDNER *et al.*, 2010).

Nesse sentido, um dos maiores e mais anunciados efeitos das mudanças climáticas é a diminuição e/ou alteração na distribuição das chuvas em todo o mundo. A seca, nesse caso, torna-se uma das maiores preocupações para o setor agrícola, uma vez que o déficit hídrico é um dos fatores que mais limita o crescimento e a produtividade das culturas. Plantas sob condições de baixa disponibilidade hídrica apresentam danos em vários processos fisiológicos, culminando com a perda da produtividade e, em condições mais severas, até a mortalidade (ZHANG *et al.*, 2014).

Com destaque na silvicultura brasileira e mundial, espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico, o que está diretamente associado com as características genéticas de cada espécie. De maneira geral, as espécies de *Eucalyptus*, quando estão em condições de déficit hídrico, possuem a tendência de reduzir a biomassa, aumentar a relação raiz/parte aérea, aumentar a resistência estomática e, por consequência, reduz a transpiração e a fotossíntese líquida (SUSILOUTO; BERNINGER, 2007).

Todos os mecanismos citados são iniciados devido ao reconhecimento das relações hídricas solo/planta por osmoprotetores presentes nas membranas, os quais desencadeiam uma sinalização sistêmica na planta. Esta sinalização, por sua vez, ativa genes funcionais que codificam proteínas relacionadas diretamente com a homeostase celular e do organismo, tais como proteínas quinases, que atuam no fechamento e abertura estomática, enzimas antioxidantes e proteínas de biossíntese de osmorreguladores (KUROMORI *et al.*, 2014).

O estresse hídrico também altera o equilíbrio da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos e respiratórios e aumenta a taxa de fotorrespiração, resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SOFO *et al.*, 2005). As EROs podem desempenhar dois papéis antagonistas; se por um lado agem como mensageiros secundários em vários fenômenos fisiológicos importantes, por outro, podem induzir danos oxidativos sob

várias condições de estresse ambiental, como salinidade, seca, frio, metais pesados, radiação UV, dentre outros, quando o equilíbrio entre produção e eliminação dessas moléculas é alterado. Os danos celulares se manifestam na forma de degradação de biomoléculas como pigmentos fotossintéticos, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, que culminam com a morte celular. Para garantir a sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes de duas formas: i) componentes enzimáticos, composto por várias enzimas, dentre elas a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodeidroascorbato (MDHAR), peroxidase do guaiacol (GPX) e glutatioma redutase (GR) e; (ii) antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico (AA), carotenóides, flavonóides, entre outros (KAUSHIK, 2014).

Além de serem dependentes do genótipo, severidade e duração do déficit hídrico (CAVATTEE *et al.*, 2012), as respostas à seca também podem ser moduladas por alterações impostas por episódios anteriores de seca (VIRLOUVET; FROMM, 2015, FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016). Essas respostas por eventos anteriores são decorrentes de modificações estruturais, genéticas e bioquímicas resultantes de uma exposição ao estresse que permitem que as plantas ‘lembrem’ eventos passados (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016), e melhoram sua adaptação e resistência a futuros episódios de estresse (KINOSHITA; SEKI, 2014)

Na tentativa de melhor entender os aspectos fisiológicos e bioquímicos de genótipos de eucalipto submetido a seca, objetivou-se com este trabalho contrapor dois genótipos contrastantes, VM1 e VM5 do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*. Além disso, verificar se déficits hídricos recorrentes promovem alterações nas plantas, a ponto de deixá-las mais tolerantes quando forem expostas a condições de seca.

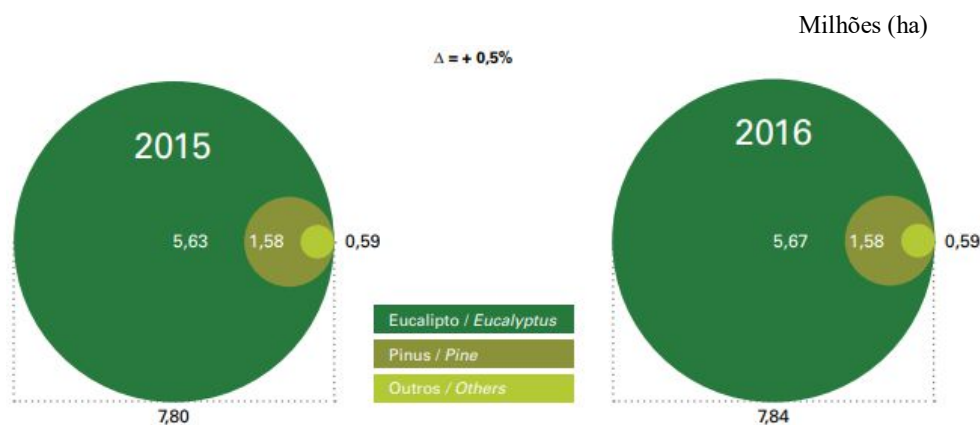
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Eucalyptus*

A família Myrtaceae é amplamente distribuída no hemisfério sul e compreende cerca de 144 gêneros e 4.630 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes (JUDD *et al.*, 2009). As espécies desta família são utilizadas na fabricação de materiais ornamentais, na produção de frutos e óleos essenciais, sendo exploradas economicamente de diferentes formas (DANNER *et al.*, 2010; LONGUE JR.; COLODETTE, 2013; CUNHA *et al.*, 2016). Dentre elas, destacam-se as espécies do gênero *Eucalyptus*, com cerca de 700 espécies distribuídas principalmente na Austrália, país de origem, e cultivadas em mais de vinte milhões de hectares nas regiões tropicais e temperadas do mundo (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

O Brasil conta com uma das maiores áreas florestais do globo, com 485,8 milhões de hectares, ou 58% da área do país (SFB, 2017). Destes, apenas 7,84 milhões de hectares correspondem a florestas plantadas, sendo essa pequena área capaz de suprir quase 91% do total da oferta de madeira utilizada para fins industriais e gera 6,2% do PIB industrial do país (IBÁ, 2017). Em 2016, por exemplo, a área coberta por eucalipto totalizou 5,67 milhões de hectares (FIGURA 1).

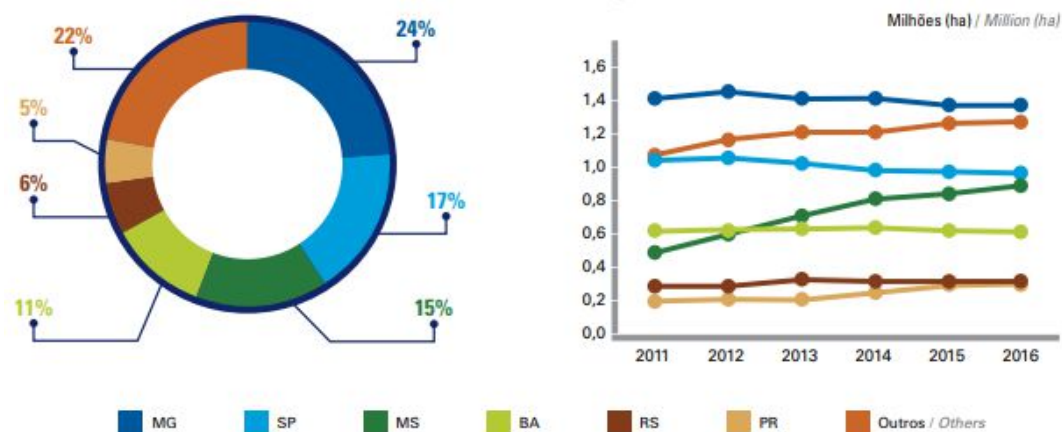
Figura 1- Área de árvores plantadas no Brasil.



Fonte: IBÁ (2017).

Atualmente, os estados com maior área plantada de florestas de eucalipto são Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso de Sul, com a eucaliptocultura expandindo e crescendo em todo o país (IBÁ, 2017).

Figura 2 - Distribuição e evolução da área plantada com eucalipto por estado brasileiro.



O aumento constante pela demanda de madeira e seus derivados é resultado do crescimento da população, que passa a exigir uma produção cada vez maior, tornando-se necessária a utilização de terras do Cerrado de qualidade inferior, porém, abundantes e de menor preço. A expansão da silvicultura também é impulsionada pela grande demanda de mercado das indústrias moveleiras, siderúrgicas e, em especial, pelo segmento de celulose e papel, que teve investimentos realizados por empresas nacionais. A expectativa é que a área com florestas plantadas mais que dobrará entre 2020/2030, dependendo do impacto de políticas públicas que favoreçam o incremento dos reflorestamentos (BRASIL, 2014).

O eucalipto é altamente produtivo, e devido à ampla variabilidade genética, associada com as tecnologias de manejo, é possível selecionar plantas adequadas para diferentes solos e condições climáticas, permitindo rápida acumulação de biomassa e fornecimento de madeira para diversos fins. Por essa razão, o eucalipto tem se tornado uma das principais espécies florestais plantadas no país.

Apesar da alta produtividade nacional, média $36 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, nas próximas décadas ocorrerá aumento da demanda por produtos oriundos das espécies de eucalipto, necessitando de genótipos ainda mais produtivos e mais eficientes na utilização de recursos hídricos (OTTO *et al.*, 2014).

A utilização de clones possibilitou a formação de florestas com alta qualidade, satisfazendo a necessidade industrial com o aumento da uniformização da qualidade da madeira gerada (BERGER *et al.*, 2002), fixando as características combinadas dos genótipos selecionados, com as expressões fenotípicas desejáveis e com o vigor esperado. Assim, o grande desafio é desenvolver novas combinações genéticas que não existem na natureza, com

a expectativa de que o novo material expresse as características desejáveis no local de plantio (FONSECA *et al.*, 2010).

Dentre as combinações existentes, encontra-se o híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (Urocam), desenvolvido para ser cultivado no cerrado, pois agrega as características de tolerância às condições de estresse abiótico, como déficit hídrico, com as características de crescimento das duas espécies.

2.2 Estresse ambiental

O termo estresse ambiental geralmente tem sido utilizado para descrever o impacto de condições adversas ou influências ambientais desfavoráveis sobre as plantas, o que acarreta em mudanças nas respostas fisiológicas dos indivíduos (LARCHER, 2006). Em condições naturais, as plantas estão frequentemente expostas ao estresse ambiental, e mesmo sob condições de estresse temporário, a vitalidade da planta se torna cada vez menor, conforme a duração do estresse (TAIZ *et al.*, 2017). Quando a planta alcança o seu limite de capacidade de ajuste, os distúrbios que antes não se manifestavam aparecem na forma de injúrias irreversíveis (LARCHER, 2006).

Há varios anos, estudos vêm sendo realizados na tentativa de obter informações sobre as respostas e adaptações das plantas a condições adversas impostas pelo ambiente e, atualmente, essas respostas têm grande valia, devido ao aumento dessas situações que podem trazer prejuízos irreversíveis às plantas. Uma espécie estará apta a sobreviver em um determinado ambiente, quanto maior for a sua resistência a todos os fatores impactantes, quanto mais cedo esses fatores cessarem e quanto menos frequentes forem (SANTOS *et al.*, 2006).

As plantas são totalmente dependentes dos fatores bióticos e abióticos que as cercam, sendo estes, determinantes para a sua sobrevivência (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Dessa forma, quando expostas a condições estressantes são capazes de se ajustar em prol de uma aclimação, desenvolvendo variados mecanismos de proteção (HIRT, 2003; SANTOS *et al.*, 2006).

2.3 Déficit hídrico

O eucalipto é plantado em mais de 90 países e, no Brasil, abrange regiões com as mais variadas condições climáticas. Nas últimas décadas, as plantações têm se expandido para

regiões mais tropicais do Nordeste e Centro-Oeste; nessas regiões de terras baratas, mas com uma estação seca caracterizada pelo alto déficit hídrico. O maior desafio é obter génotipos adaptados a essas condições adversas (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Os plantios clonais são, atualmente, uma regra na eucaliptocultura, tanto nas atuais áreas produtivas quanto nas novas fronteiras florestais. No entanto, nas áreas tradicionais há maior segurança quanto à adaptação e a capacidade produtiva dos plantios, enquanto que em novas áreas há maiores riscos de perda de produtividade devido a estresses ambientais distintos daqueles de onde os clones foram selecionados, sendo, de suma importância entender a vulnerabilidade dos clones a essas mudanças.

Dentre os principais estresses ambientais que afetam negativamente a cultura do eucalipto, os estresses hídricos e térmicos destacam por estarem presentes nas novas fronteiras florestais. Além desses fatores, é importante considerar as variações de regime hídrico e térmico intra e interanual nas atuais áreas de plantio, devido as mudanças climáticas, que impõem uma maior compreensão da sensibilidade dos clones a esses estresses (STAPE *et al.*, 2014).

A disponibilidade de água no solo e na atmosfera mostrou ser o principal fator que limita a produtividade nas plantações de eucalipto (VILLAR *et al.*, 2011). Estudos ecofisiológicos mostraram que diferentes génotipos diferem quanto a capacidade de tolerar a seca. Esse fato levou à prática atual de considerar o desempenho da planta em condições ambientais variadas durante o processo de seleção de génotipo (NAVARRETE-CAMPOS *et al.*, 2012).

A seca pode reduzir o rendimento das plantações de eucalipto em até um terço em rotações de seis a sete anos, em locais próximos da Costa Atlântica do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2010). Entretanto, enquanto a exposição a fatores, como seca, fogo e pragas, podem reduzir a produtividade, as plantações de eucalipto podem ser beneficiadas pela exposição a níveis crescentes de CO₂ atmosférico, por meio de efeitos na fotossíntese e eficiência no uso da água (BOOTH, 2013).

O déficit hídrico provoca diversas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas. Essas alterações levarão, inicialmente, a um estado de aclimação e, mais tarde, à medida que o estresse hídrico se intensificar, podem inibir o crescimento devido ao fechamento dos estômatos, menor assimilação de CO₂ e síntese de fotoassimilados, diminuição da área foliar, menor eficiência fotossintética, menor expansão radicular, entre outras (BARTELS; SUNKAR, 2005). Além desses fatores, *Eucalyptus ssp.*, por ser uma espécie lenhosa, o embolismo nos vasos do xilema prejudica muito o desenvolvimento da

planta sob déficit hídrico intenso (CHOAT *et al.*, 2012). Com o solo seco, a tensão nos vasos do xilema aumenta, proporcionando maior probabilidade de cavitação e, conseqüentemente, menor condutividade hídrica (BRODERSEN *et al.*, 2013). Além disso, foi verificado que o declínio na condutividade do xilema está associado com o fechamento estomático e diminuição da eficiência fotossintética (MARTORELL *et al.*, 2013).

2.4 Respostas da planta ao déficit hídrico

O estresse pode ser geralmente definido como um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Esse conceito está intimamente associado com tolerância ao estresse, que é a capacidade da planta em suportar condições desfavoráveis. Se a tolerância aumenta em consequência da exposição anterior ao estresse, se diz que a planta está aclimatada (TAIZ *et al.*, 2017).

Em condições naturais e agrícolas, fatores ambientais, como temperatura do ar, podem se tornar estressantes em apenas alguns minutos. O conteúdo de água no solo pode levar dias ou semanas, enquanto outros fatores como a deficiência mineral do solo, podem levar meses para se tornar estressantes. Respostas celulares ao estresse podem incluir mudanças no ciclo e divisão celular, na estrutura das membranas e paredes celulares e no metabolismo, de forma geral (BRAY *et al.*, 2001).

O déficit hídrico em plantas provoca um complexo de respostas, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas e metabólicas. Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, ativa uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgescência celular, ou a concentração de solutos, altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando o fenômeno físico do déficit hídrico em respostas bioquímicas (BRAY, 2001).

Há algum tempo, adota-se a hipótese de que o ajuste osmótico (osmoproteção) é uma característica importante de aclimação que confere vantagens às plantas tolerantes ao estresse hídrico, pois é um modo de manter o conteúdo de água da célula em níveis adequados às funções fisiológicas (TAIZ complexo de respotas., 2017). No entanto, existe outra vertente que faz ressalvas ao ajuste osmótico como um mecanismo de manutenção da turgescência e do crescimento do tecido sob deficiência hídrica ou estresse, pois o processo seria limitado

pela própria fotossíntese, que é a fonte de solutos orgânicos, e que, em condições de estresse hídrico, é reduzida (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

Assim, uma função do ajuste osmótico poderia estar potencialmente ligada a eliminação de radicais livres, mas gerando, como função adicional, a retenção de água (ANGELOCCI, 2002). O estresse hídrico ‘quebra’ o equilíbrio oxidativo/reduutivo (redox) em várias organelas celulares, como os cloroplastos e as mitocôndrias. O declínio na funcionalidade dos cloroplastos, inevitavelmente, leva à geração de espécies reativas de oxigênio.

O estresse desempenha importante papel na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais. O estresse é medido em relação a sobrevivência da planta, produtividade agrícola, crescimento (acúmulo de massa seca) e ao processo primário de assimilação (absorção de CO₂ e de minerais), que estão relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal (TAIZ complexo de respostas., 2017).

Quando expostas a condições de déficit hídrico, as plantas apresentam respostas que basicamente se resumem a três principais eventos: percepção dos sinais, respostas em nível molecular e respostas morfofisiológicas.

Dentre os mecanismos de tolerância ao estresse hídrico, variações das respostas fisiológicas, bioquímicas, bem como estratégias de crescimento têm sido comparadas e discutidas em relação às características de tolerância de plantas à deficiência hídrica no solo (BARTELS; SUNKAR, 2005).

Alterações no metabolismo a nível molecular dos vegetais provocam, dentre outras reações, redução no teor de proteínas, como consequência da redução na sua síntese ou na decomposição acentuada, resultando na liberação de aminoácidos. Neste caso, há um acréscimo da atividade da enzima glutamina sintetase, responsável pelo metabolismo de aminoácidos, como a prolina (FERREIRA *et al.*, 2002). Um exemplo de redução da atividade enzimática é o decréscimo da conversão da sacarose para amido nas folhas devido a diminuição da atividade da invertase, enzima chave na conversão de sacarose para hexoses (SILVA; ARRABAÇA, 2004).

2.5 Ativação de mecanismos de tolerância ao déficit hídrico

O início do estresse hídrico ativa alguns sensores primários, que por sua vez, ativam as vias citoplasmáticas, podendo acarretar em acúmulo iônico como, por exemplo, o de íons Ca²⁺. Além disso, pode ocorrer a sinalização para a síntese de proteínas, levando à expressão

de genes responsivos ao estresse e a alterações fisiológicas (BRESSAN *et al.*, 1998). A partir daí, as plantas ativam mecanismos de fechamento estomático reduzindo a transpiração, mecanismo que é mediado pelo ácido abscísico (ABA). Esse fitohormônio é sintetizado nas raízes e translocado para as partes superiores das plantas, em especial para as folhas. O ABA é então conduzido, na sua forma aniônica, para o interior das células dos estômatos, que são induzidos a fechar, diminuindo assim, a condutância estomática (TAIZ *et al.*, 2017).

A menor condutância estomática em função da maior resistência às trocas de gases leva também a menores perdas de água. Essa é uma das primeiras respostas das plantas ao déficit hídrico. No entanto, essa alternativa resulta em menor taxa fotossintética, uma vez que diminui o fluxo de gases, principalmente CO₂ (FUJITA *et al.*, 2004). As condições de déficit hídrico reduzem a atividade das ATPases de membrana plasmática devido ao menor fornecimento de ATP pela fotossíntese e respiração. Essa diminuição no aporte de ATP está também relacionada a danos no aparato do fotossistema II, ocasionado pela diminuição da disponibilidade de água na planta (GUIDI; DEGL'INNOCENTI, 2008).

Conforme o estresse vai se intensificando, outros mecanismos são ativados na tentativa de resistir a falta de água, ocorrendo redução na condução hidráulica das raízes. Essas modificações são acompanhadas por alterações na taxa de crescimento desse órgão (COSTA; SILVA *et al.*, 2008). A tendência é que plantas estressadas direcionem o carbono assimilado para o sistema radicular e, dessa forma, mantenham o sistema em crescimento ativo, permitindo a maximização da absorção de água (GUO *et al.*, 2010).

Durante a evolução, as plantas desenvolveram vários mecanismos de aclimação, incluindo várias vias de regulação para superar o estresse induzido por fatores ambientais desfavoráveis. Para que haja controle das EROs, o organismo conta com a ação de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), dentre outras, e também antioxidantes não enzimáticos como ascorbato, carotenoides, antocianinas, tocoferóis e glutathione. Esses elementos desempenham papel importante no controle de EROs (SHARMA *et al.*, 2012).

O processo metabólico natural das plantas resulta em formação de substâncias que, em excesso, podem ser altamente prejudiciais às células e, conseqüentemente, aos tecidos. Essas substâncias podem ser as EROs, nitrogênio e enxofre (KOLUPAEV *et al.*, 2010). O nível de produção normal dessas moléculas pode ser alterado para níveis danosos dependendo das condições ambientais as quais a planta está inserida. Essas condições podem alterar o balanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes, e essa relação é dependente das taxas relativas de geração e destruição de EROs, além do tempo de vida das suas principais espécies. Dentre os

mecanismos de defesa das plantas, estão a diminuição na taxa de geração de EROs, aumento na taxa de sua eliminação, aceleração de recuperação de estruturas de células danificadas, aumento da dissipação de calor/energia absorvida e alguns outros. Deve-se notar também que, juntamente com as EROs, o nitrogênio reativo e as espécies de enxofre desempenham um papel essencial no desenvolvimento de estresse oxidativo na célula. Um dos principais produtores de EROs são as cadeias fotossintéticas de transferência de elétrons que ocorrem nos cloroplastos (DAT *et al.*, 2000). Sob condições que prejudicam a fixação de CO₂ nos cloroplastos, a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) aumenta e o glicolato produzido se move para os peroxissomos, onde é oxidado pela glicolato oxidase, formando H₂O₂ que é convertido em H₂O pela enzima catalase (DINAKAR *et al.*, 2010). Os sistemas redox ativos, como tioredoxina e plastoquinona, podem funcionar através de vias de transdução de sinal ou por meio de mensageiros secundários no citosol em resposta a estresses abióticos. Os sinais que surgem durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons também podem alterar a expressão de genes pela geração de sinais sistêmicos no processo conhecido como resistência sistêmica adquirida (KRESLAVSKIA *et al.*, 2012).

A espécie do gênero *Eucalyptus* possuem alta eficiência em eliminar EROs, fato que é comprovado pela alta variedade de clusters para enzimas antioxidantes, possuindo uma das maiores famílias de genes codificantes para SOD. No total, 12 clusters foram identificados para isoformas desse grupo de enzimas (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Além disso, o gênero possui 6 clusters codificantes para APX, 3 para catalase, 36 para dehidroascorbato (DHAR), 2 para glutathione redutase (GR) e 4 para MDHAR (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

2.6 Memória do estresse

Alguns estudos recentes têm focado no efeito que um evento de estresse prévio tem sob a tolerância aos eventos de estresse subsequentes (MENEZES *et al.*, 2017; GUEDES *et al.*, 2018; MARCOS *et al.*, 2018). Assim, plantas que sofreram estresse prévio respondem mais rápido e/ou mais forte a um estresse subsequente, seja biótico ou abiótico (CONRATH *et al.*, 2006). Isso indica que as plantas têm a capacidade de memória (*stress imprint*) após o primeiro evento de estresse. Essas respostas das plantas diante de um evento de estresse são controladas a nível molecular por mudanças na expressão de genes, mas que ainda não são bem entendidas (BRUCE *et al.*, 2007). Há evidências de que existem dois mecanismos de memória, um por acúmulo de proteínas sinalizadoras e outro por acúmulo de fatores de transcrição (CONRATH *et al.*, 2006). Além desses, há um terceiro mecanismo, o epigenético,

que envolve mudanças na atividade do DNA, como por exemplo, através da metilação do DNA ou modificação de histonas (MADLUNG; COMAI, 2004).

Quanto ao estágio de plantas jovens, verificou-se aumento da fotoproteção em *Arrhenatherum elatius* (L.) P. Beauv. ex J. Presl & C. Presl. quando houve a reincidência de déficit hídrico, através do decréscimo da eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), indicando aumento da dissipação de energia para prevenir o dano oxidativo (WALTER *et al.*, 2011). Além disso, observou-se em uma erva daninha (*Conyza bonariensis* L. Cronquist) pré-estressada com um herbicida, maior tolerância ao estresse oxidativo através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (YE; GRESSEL, 2000).

As sementes, quando passam por um período de estresse, podem ser capazes de ‘memorizar’ alterações causadas por esse evento, e desta forma, podem responder ao estresse de forma diferenciada no estado de planta. Recentemente, alguns trabalhos têm sido publicados sobre este tema, como foi observado em sementes de *Cucumis melo* L., que foram acondicionadas em diferentes soluções osmóticas (KNO₃, KH₂PO₄, KNO₃ + KH₂PO₄, PEG e manitol). Estas germinaram mais rápido e originaram plântulas com radícula e parte aérea de comprimento maior, quando comparadas com as sementes não condicionadas (NASCIMENTO, 2003). Sementes de *Triticum aestivum* L. pré-tratadas com solução salina, foram mais tolerantes à salinidade durante todo o período de crescimento (IQBAL; ASHRAF, 2007); sementes de *Glycine max* (L.) Merr., que foram submetidas a pré-tratamento com soluções polietilenoglicol (PEG), com diferentes potenciais osmóticos apresentaram estabelecimento mais rápido das plântulas (ROUHI *et al.*, 2011); sementes de *Nicotiana tabacum* L., que sofreram pré-tratamento com putrescina, apresentaram maior tolerância ao frio, pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (XU *et al.*, 2011).

Ainda não são bem entendidos os mecanismos pelos quais as plantas, principalmente as arbóreas, conseguem tolerar ciclos recorrentes de déficit hídrico, desde o estágio de sementes até o porte de plantas jovens, uma vez que a maioria dos trabalhos publicados abordam poucos parâmetros isoladamente. Assim, estudos que abordam dados de germinação, trocas gasosas, análises bioquímicas, avaliação enzimática e biometria, poderiam, coletivamente, auxiliarem neste entendimento.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.C. *et al.* Mapping the effect of spatial and temporal variation in climate and soils on *Eucalyptus* plantation production with 3-PG, a process-based growth model. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 259, p. 1730-1740, 2010.
- ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 272 p.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Plant Sciences**, [S.l.], v. 24, p. 23-58, 2005.
- BERGER, R. *et al.* Efeito do espaçamento e da adubação no crescimento de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith. **Ciência Florestal**, [S.l.], v. 12, p. 75-87, 2002.
- BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 301, p. 28-34, 2012.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p. 1158-1203.
- BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Plants use calcium to resolve salt stress. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 3, p. 411-412, 1998.
- BRODERSEN, C. *et al.* In vivo visualizations of drought-induced embolism spread in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 162, p. 1-10, 2013.
- BRUCE, T. J. A. *et al.* Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, [S.l.], v. 173, p. 603-608, 2007.
- CAVATTE, P. C. *et al.* Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 144, p. 111-122, 2012.
- CHOAT, B. *et al.* Global convergence in the vulnerability of forests to drought. **Nature**, [S.l.], v. 491, 2012.
- CONRATH, U. *et al.* Priming: Getting Ready for Battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S.l.], v. 19, p. 1062-1071, 2006.
- COSTA E SILVA, F. *et al.* Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. **Tree Physiology**, [S.l.], v. 29, p. 77-86, 2009.
- CUNHA, L. L. T.; LUCENA, E. M. P. D.; BONILLA, O. H. Exigências térmicas da floração à frutificação de quatro espécies de Myrtaceae em ambiente de Restinga **Revista Brasileira de Geografia Física**, [S.l.], v. 9, p. 511-525, 2016.
- DANNER, M. A. *et al.* Fenologia da floração e fruticultura de mirtáceas nativas da floresta com araucária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.l.], v. 32, p. 291-295. 2010.

- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [S.l.], v. 2, 2014.
- DAT, J. *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S.l.], v. 57, p. 779-795, 2000.
- DINAKAR, C. *et al.* Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. **Planta**, [S.l.], v. 231, p. 461-464, 2010.
- DODD, N. *et al.* Plant Circadian Clocks Increase Photosynthesis, Growth, Survival, and Competitive Advantage. **Science**, [S.l.], v. 309, p. 630-633. 2005.
- FERREIRA, V. M. *et al.* Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.
- FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 7, 2016.
- FUJITA, M. *et al.* A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **The Plant Journal**, [S.l.], v. 39, p. 863-876, 2004.
- GONÇALVES, J. L. M. *et al.* Integrating genetic and silvicultura strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 301, p. 6-27. 2013.
- GRATTAPAGLIA, D; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**. [S.l.], v. 179, p. 911-929, 2008.
- GUEDES, F. A. F. *et al.* Transcriptional memory contributes to drought tolerance in coffee (*Coffea canephora*) plants. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 147, p. 220-233, 2018.
- GUIDI, L.; DEGL'INOCENT, E. **Imaging of Chlorophyll a Fluorescence: A Tool to Study Abiotic Stress in Plants**. 1 ed. Pisa: Shanker e Venkateswarlu, 2008.
- GUO, X. Y.; ZHANG, X. S.; HUANG, Z. Y. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. **Journal of Plant Ecology**, [S.l.], v. 3, p. 79-87, 2010.
- HIRT, H. Introduction. *In*: HIRT, HIRT, H.; SHINOZAKI, K. (Org.) **Plant responses to abiotic stress: Topics in Current Genetics**, 2003. V. 4. p. 151-185.
- IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2017**. Brasília: IBÁ, 2017. p 15-39.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**. 2013.

- IQBAL, M.; ASHRAF, M. Seed treatment with Auxins Modulates Growth and Ion Partitioning in Salt-stressed Wheat Plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, [S.l.], v. 49, p. 1003-1015, 2007.
- JUDD, W. S. *et al.* **Sistemática Vegetal** - um enfoque filogenético. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 632.
- KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation. **Plant & Cell Physiology**, [S.l.], v. 55, p. 1859-1863. 2014.
- KOLUPAEV YU. E. *et al.* **Formation of Adaptive Plant Responses to Abiotic Stresses**, 1 ed. Kiev: Osnova, 2010.
- KRESLAVSKI, V. D. *et al.* Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, [S.l.], v. 13, p. 190-203, 2012.
- KUROMORI, T. *et al.*, Drought stress signaling network. *In*: HOWELL, S. H. (Eds.). **Molecular Biology**. New York: Springer, 2014. p. 383-409.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. 3 ed. São Carlos: Rima 2006.
- LINDNER, M. *et al.* Climate change impacts, adaptive capacity, and vulnerability of European forest ecosystems. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 259, p.698-709. 2010.
- LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [S.l.], v. 33, p. 429-438. 2013.
- MARCOS, F. C. C. *et al.* Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 223, p. 9-18, 2018.
- MARTORELL, S. *et al.* Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. **Plant, cell & environment**, [S.l.], v. 37, p. 617-626, 2014.
- MENEZES-SILVA, P. E. *et al.* Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 15, p. 4309-4322, 2017.
- NAVARRETE-CAMPOS, D. *et al.* Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. **New Forests**, [S.l.], v. 44, p. 119-134. 2012.
- OTTO, M. S. G. *et al.* Dominant clonal *Eucalyptus grandis* x *urophylla* trees use water more efficiently. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 328, p. 117-121, 2014.
- ROUHI, H. R. *et al.* Study of different priming treatments in germination traits of soybean seed lots. **Notulae Scientia Biologicae**, [S.l.], v. 3, p. 101-108, 2011.

- SAZE, H. *et al.* Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, [S.l.], v. 319, p. 462-465, 2008.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 333- 341, 2002.
- SFB. Serviço Florestal Brasileiro. **Florestas do Brasil em resumo**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro. 2017. 188 p.
- SHARMA, S. *et al.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, [S.l.], ID 217037, 2012.
- SILVA, J. M.; ARRABAÇA, M. C. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C4 grass *Setaria sphacelata*: a comparison between rapidly and slowly imposed water stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.16, p.551-555, 2004.
- SOFO, A. *et al.* Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. **Plant Science**, [S.l.], v.169, p. 403-412. 2005.
- STAPE, J. L. *et al.* Fatores hídricos e as decisões de silvicultura, de melhoramento e de proteção na eucaliptocultura. *In*: ENCONTRO BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 3., 2014, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Embrapa Florestas, 2014. p. 81-98.
- SUSILUOTO, S.; BERNINGER, F. Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. **Silva Fennica**, [S.l.], v. 41, p. 221-233, 2007.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TEIXEIRA, F. K. *et al.* Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. **Genetics and Molecular Biology**, [S.l.], v. 28, p. 529-538, 2005.
- VILLAR, E. *et al.* RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, [S.l.], v. 12. 2011.
- VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, [S.l.], v. 205, p. 597-607, 2015.
- WALTER, J. *et al.* Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**. v.71, p. 34-40, 2011.
- XU, S. *et al.* Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. **Plant Growth Regulation**, [S.l.], v. 63, p. 279-290, 2011.
- YE, B.; GRESSEL, J. Transient, oxidant-induced antioxidant transcript and enzyme levels correlate with greater oxidant-resistance in paraquat-resistant *Conyza bonariensis*. **Planta**, [S.l.], v. 211, p. 50-61, 2000.

ZHANG, M. *et al.* Phosphoproteome analysis reveals new drought response and defense mechanisms of seedling leaves in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Proteomics**, [S.l.], v. 109, p. 290-308. 2014.

CAPÍTULO 2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *EUCALYPTUS* SPP SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

Com destaque na silvicultura brasileira e mundial, espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico, o que está diretamente associado com as características genéticas de cada espécie. Nesse sentido, objetivou-se com o presente estudo, comparar dois clones do híbrido *E. urophylla* x *E. camaldulensis* e identificar os principais fatores fisiológicos e bioquímicos que contrastam os clones VM1 e VM5. Foram utilizadas 96 plantas para cada clone, sendo estas divididas em 8 tratamentos com 12 plantas cada. A imposição do déficit hídrico aconteceu com a suspensão diária da irrigação em cada tratamento, de forma sequenciada, onde no final do sexto dia, tinha-se tratamentos com estresse de um a seis dias, além de um tratamento testemunha (sempre irrigado) e outro para a resiliência. Durante o período do estresse, o potencial hídrico foliar reduziu gradativamente em todos os tratamentos apresentando valor mínimo de -2,7 MPa no sexto dia. Para as variáveis de trocas gasosas, observou-se que o VM5 apresentou valores maiores em todas elas, e o aumento dos dias de estresse provocou redução nestas mesmas variáveis, chegando ao seu mínimo no sexto dia de déficit hídrico. Quanto aos aspectos bioquímicos, os tratamentos que ficaram mais dias sob déficit hídrico apresentaram elevação nos níveis de H₂O₂ e na peroxidação lipídica. A atividades das enzimas do complexo antioxidante apresentaram pico de atividade no terceiro e quarto dia após o início do déficit hídrico. O tratamento de resiliência apresentou boa recuperação com todas as suas variáveis, mostrando valores próximos ao controle. Os dados mostram que o clone VM5 apresentou características de crescimento melhores do que o VM1, no entanto, quando se trata de tolerância ao déficit hídrico, o clone VM1 se mostrou mais tolerante, reduzindo variáveis que confeririam maior acúmulo de biomassa e ativando antecipadamente os mecanismos de defesa.

Palavras-chave: Eucalipto. Silvicultura. Estresse abiótico. Trocas gasosas.

ABSTRACT

With emphasis on Brazilian and world forestry, species of the genus *Eucalyptus* present different levels of tolerance to the water deficit, which is directly associated with the genetic characteristics of each species. In this sense, the objective of this study was to compare physiologically and biochemically two clones of the hybrid *E. urophylla* x *E. camaldulensis* and to identify the main factors that contrast between the clones VM1 (tolerant) and VM5 (sensitive). From each clone were used 96 plants, which were divided into 8 treatments with 12 plants each. The imposition of the water deficit occurred with the daily suspension of irrigation in each treatment, so that at the end of the sixth day there were treatments with stress from one to six days, in addition to a control treatment (always irrigated) and another to the resilience. During the stress period, leaf water potential decreased gradually in all treatments reaching the minimum value of -2.7 MPa with six days of water deficit. For the variables of gas exchange it was observed that the VM5 presented higher values in all of them, and the increase of the days of stress caused reduction for these same variables, reaching their minimum on the sixth day of water deficit. Concerning the biochemical aspects, the treatments that remained more days under water deficit showed an increase in H₂O₂ levels and lipid peroxidation. The activity of the antioxidant complex enzymes showed peak activity on the third and fourth day of water deficit. The resilience treatment presented good recovery with all its variables, showing values close to the control. In addition, clone VM1 was able to recover with greater vigor than VM5. The data show that the VM5 clone presented better growth characteristics than VM1, however, when it comes to tolerance to water deficit the clone VM1 was more tolerant, reducing the variables that would give greater accumulation of biomass and activating in advance the mechanisms of defense.

Key words: Eucalypts. Silviculture. Abiotic stress. Gas exchange.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* compreende mais de 700 espécies distribuídas principalmente na Austrália, país de origem, e cultivada em mais de vinte milhões de hectares nas regiões tropicais e temperadas do mundo (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008).

No Brasil, o eucalipto é altamente produtivo, e devido à ampla variabilidade genética, associada às tecnologias de manejo, é possível selecionar plantas adequadas para diferentes solos e condições climáticas, permitindo rápida acumulação de biomassa e fornecimento de madeira para diversos fins. Por essa razão, o eucalipto tem se tornado uma das principais espécies florestais plantadas no país.

Apesar da alta produtividade nacional ($36 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), nas próximas décadas, a tendência é que ocorra aumento da demanda por produtos oriundos das espécies de eucalipto, necessitando assim, de genótipos ainda mais produtivos e mais eficientes na utilização de recursos hídricos (OTTO *et al.*, 2014). Processos fisiológicos são modificados em condições de estresse hídrico. Tais processos englobam a abertura e fechamento estomático, transpiração, respiração, fotossíntese, produção de ácido abscísico (ABA), abscisão foliar e ajuste osmótico. Além disso, graves danos que prejudicam o crescimento vegetal, como a diminuição da expansão celular, são causados pela deficiência hídrica (TAIZ *et al.*, 2017).

As respostas das plantas em condições de déficit hídrico são altamente complexas, pois envolvem alterações em diferentes locais, como também em diferentes escalas de tempo em relação ao desenvolvimento da planta. A intensidade, duração e a taxa de evolução do estresse influenciam as respostas das plantas à escassez de água, pois esses fatores determinam se os processos de mitigação relacionados com a aclimatação ocorrerão ou não (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Os sintomas de deficiência hídrica no eucalipto são mais drásticos e visíveis na fase de muda (SILVA *et al.*, 2004), afetando seu desenvolvimento inicial. Dessa forma, os estudos das relações entre desenvolvimento, crescimento e deficiência hídrica nas espécies de *Eucalyptus* ssp. durante a fase de muda, assume primordial relevância para que não seja afetado o crescimento e o desenvolvimento da muda no viveiro e, conseqüentemente, o sucesso na implantação da floresta.

Os programas de melhoramento genético do eucalipto têm alcançado avanços significativos na obtenção de progênies com ganhos genéticos, principalmente em relação ao crescimento, adaptação e tolerância a diversos estresses (ROCHA *et al.*, 2007). Hipotetizando que genótipos contrastantes seriam diferentemente afetados pelo déficit hídrico

e na tentativa de melhor entender as alterações fisiológicas do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*, em condições de seca, objetivou-se com este trabalho comparar dois clones do híbrido VM1 e VM5 e, assim, identificar os principais fatores fisiológicos e bioquímicos que contrastam entre um clone e outro em condições de déficit hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Plantas de dois clones do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis* (VM 1: tolerante ao déficit hídrico e VM 5: sensível ao déficit hídrico) foram estabelecidas *in vitro* e, em seguida, clonadas para obtenção do material vegetal necessário para o experimento de déficit hídrico.

O meio inicial de multiplicação foi constituído de sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de sacarose (20 g L⁻¹) e dos reguladores ácido 3-indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) e geleificado com 1,7 g L⁻¹ de Phytigel®. Posteriormente, as plantas foram transferidas para o meio de cultura contendo sais e vitaminas do meio WPM (WOOD PLANT MEDIUM; LLOYD; MC COWN, 1981) suplementado com 20,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,02 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), para obtenção de microcepas (tufos contendo inúmeros brotos de tamanho reduzido, ± 3,0 mm).

As microcepas formadas foram inoculadas em meio de cultura de alongamento contendo 20 g L⁻¹ de glicose e a combinação dos seguintes reguladores de crescimento: 0,1 mg L⁻¹ ANA, 0,1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e 0,01 mg L⁻¹ de BAP. Ao longo do período de cultivo, as microestacas com tamanho aproximado de 2,0 cm foram cortadas e transferidas para meio de enraizamento constituído de WPM (½ sais), 15 g L⁻¹ de glicose e mesma concentração dos reguladores da etapa de alongamento. Ainda no meio de enraizamento, as microestacas tiveram seus ápices cortados para retirada da dominância apical, multiplicação e uniformização do tamanho final das plantas.

Para a aclimatização em casa de vegetação, as plantas com aproximadamente 3,0 cm de altura e com raízes bem desenvolvidas foram inicialmente transferidas para bandejas de plástico (342 x 240 x 115 mm) contendo vermiculita e protegidas com saco plástico para a manutenção da umidade por 15 dias, formando assim uma miniestufa. Durante este período, as plantas foram irrigadas e adubadas constantemente e o saco plástico aberto progressivamente, através de cortes em suas laterais.

Em seguida, as plantas foram transplantadas para potes de 770 mL contendo latossolo vermelho (TABELA 1) e irrigados em sua capacidade de campo por quatro semanas. Ressalta-se que todos os potes foram preenchidos com a mesma quantidade de solo (600 g de solo seco) para uniformização do experimento.

Tabela 1- Análise do solo utilizado no experimento de déficit hídrico.

Classe	Hz	Profundidade	pH	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CO
		--cm--	-----cmol dm ⁻³ -----						-----%-----			---g/kg---
LVdf	A	0-26	5,6	0,16	2,50	1,80	0,10	3,62	12,25	29,65	30,34	22,27
⁽¹⁾	Bw	26-122+	5,8	0,01	0,10	0,20	0,00	1,66				6,84

⁽¹⁾ LATOSSOLO VERMELHO Distroférrico

Fonte: Do autor (2019).

2.2 Indução do déficit hídrico

A irrigação foi suspensa diariamente, um tratamento por vez, começando pelo T6 (QUADRO 1), de modo que ao final do experimento havia tratamento com um (T1), dois (T2), três (T3), quatro (T4), cinco (T5) e seis dias (T6) sem irrigação, além do tratamento controle (sempre irrigado) e a resiliência (plantas com seis dias sem irrigação, reidratadas e analisadas após 48h de reidratação), totalizando oito tratamentos, montados em blocos casualizados, em esquema fatorial duplo (Clones x Déficit Hídrico), quatro repetições com cada uma composta por três plantas, totalizando 192 plantas.

Quadro 1- Modo de irrigação dos tratamentos.

Tratamento	Dias de déficit hídrico					
	1	2	3	4	5	6
Controle	IR	IR	IR	IR	IR	IR
T1	IR	IR	IR	IR	IR	
T2	IR	IR	IR	IR		
T3	IR	IR	IR			
T4	IR	IR				
T5	IR					
T6						
Resiliência						IR

*IR = Irrigado

Fonte: Do autor (2019)

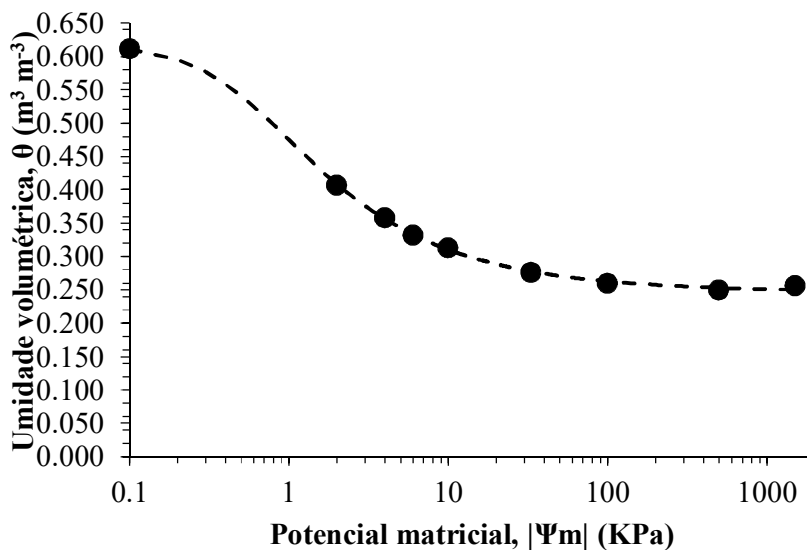
2.3 Coleta de dados

2.3.1 Potencial hídrico do solo

No sexto dia de experimento todos os vasos foram pesados em balança com precisão de 0,1 g, com o intuito de determinar o potencial hídrico do solo de acordo com a equação de duplo Van Genuchten (FIGURA 1).

Figura 1 – Representação gráfica da equação de duplo Van Genuchten para o solo.

$$\theta = 0,2475 + \frac{(0,6197 - 0,2475)}{[1 + (1,8339h)^{1,6112}]^{1-\frac{1}{1,6112}}} \quad R^2 = 0,99$$



Fonte: Do autor (2019).

2.3.2 Potencial hídrico foliar

O potencial hídrico das plantas foi determinado a partir da coleta de folhas expandidas e a avaliação utilizando-se a bomba de Scholander. As leituras foram realizadas do período de 04:00 a 06:00 horas da manhã e os resultados expressos em MPa.

2.3.3 Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E), concentração de carbono interno (C_i), eficiência instantânea no uso da água ($EiUA = A/E$, calculada relacionando a fotossíntese e transpiração), eficiência instantânea de carboxilação ($EiC = A/C_i$, a partir das relações entre fotossíntese e concentração interna carbono) foram determinadas nas folhas mais jovens completamente expandidas a partir do ápice caulinar, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições aconteceram entre 08:00 e 11:00 horas da manhã, em casa de vegetação, utilizando radiação

fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, sob condi\u00e7\u00f5es de temperatura e umidade ambiente.

2.3.4 Rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fotossistema II (Fv/Fm)

O rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fotossistema II foi determinado com um fluor\u00f4metro port\u00e1til (Mini-PAM; Walz; Alemanha) e as medidas feitas nas mesmas mudas e folhas em que foram realizadas as an\u00e1lises das trocas gasosas. Para efetuar a avalia\u00e7\u00e3o, as folhas foram adaptadas ao escuro por um per\u00edodo de 30 minutos, utilizando-se pin\u00e7as adequadas ao equipamento segundo metodologia proposta por Strasser *et al.* (2000). Determinou-se a fluoresc\u00eancia inicial (F_0), fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) e efici\u00eancia qu\u00e2ntica do fotossistema II, dada pela raz\u00e3o F_v/F_m . A fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v) foi dada pela diferen\u00e7a entre F_0 e F_m .

2.3.5 Per\u00f3xido de hidrog\u00eanio

A quantifica\u00e7\u00e3o de H_2O_2 foi realizada segundo a metodologia proposta por Velikova, Yordanov e Edreva (2000), onde 100 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrog\u00eanio l\u00edquido, homogeneizados em \u00e1cido tricloroac\u00e9tico (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 \u00b0C. Uma al\u00edquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de rea\u00e7\u00e3o composto por tamp\u00e3o fosfato de pot\u00e1ssio 2,5 mM (pH 7,0) e iodeto de pot\u00e1ssio (KI) 0,5 M. A concentra\u00e7\u00e3o de H_2O_2 foi determinada pela absorv\u00eancia das amostras a 390 nm, com base na curva-padr\u00e3o de H_2O_2 .

2.3.6 Peroxida\u00e7\u00e3o lip\u00eddica

A peroxida\u00e7\u00e3o lip\u00eddica foi determinada por meio da quantifica\u00e7\u00e3o de esp\u00e9cies reativas ao \u00e1cido tiobarbit\u00farico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N_2 l\u00edquido acrescido de 20% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/v) e homogeneizados em TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Uma al\u00edquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de rea\u00e7\u00e3o contendo TBA 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v), incubando-se, em seguida, a 95 \u00b0C, por 30 minutos. A paralisa\u00e7\u00e3o da rea\u00e7\u00e3o ocorreu pelo resfriamento r\u00e1pido em gelo e as leituras foram realizadas a 535 nm e 600 nm. A concentra\u00e7\u00e3o do

complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A535 - A600)/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

2.3.7 Enzimas do complexo antioxidante

Para as análises enzimáticas foram coletadas duas folhas, completamente expandidas, do terço superior de cada planta e imediatamente congeladas em N_2 líquido. O pool de amostras foi armazenado em ultrafreezer ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) até o momento da extração.

A extração para a quantificação da atividade enzimática foi realizada conforme protocolo de Biemelt *et al.* (1998), sendo utilizado 0,2 g de cada amostra previamente triturada, as quais foram maceradas em N_2 líquido utilizando cadinho e pistilo. Após a maceração, foi adicionado as amostras, 1,5 ml de tampão de extração contendo fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), EDTA 0,1 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,01 M e 22 mg de PVPP. A amostra foi então centrifugada a 15.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e mantido a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para todas as análises, foi utilizado o espectrofotômetro Epoch microplate, modelo Biotek. Para cada uma das 4 repetições biológicas, foi realizada uma triplicata técnica.

2.3.7.1 Dismutase do Superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Para tanto, uma alíquota de 10 μL dos extratos foi adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . As placas com o meio de reação e as amostras foram iluminadas por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W e as leituras foram realizadas a 560 nm. A atividade foi dada em unidade de SOD mg^{-1} MF.

2.3.7.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada segundo metodologia proposta por Havir e McHale (1987), em que 9 μL do extrato enzimático foram adicionados ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), previamente incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Imediatamente antes das leituras, adicionou-se o H_2O_2 (12,5 mM), para dar início a reação. A atividade dessa enzima foi

determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, realizada de 15 em 15 segundos, por 3 minutos, monitorada pelo consumo de H_2O_2 e o coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM cm^{-1} .

2.3.7.3 Redutase do Monodehidroascorbato (MDHAR)

A atividade da MDHAR foi determinada de acordo com Hossain *et al.* (1984), pela redução da absorbância em função da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Para tanto, uma alíquota de 20 μL do extrato enzimático foi adicionada ao tampão de incubação composto por Tris-HCl 50 mM, (pH 7,6), ascorbato 2,5 mM e água destilada. Imediatamente antes da leitura, foi adicionado NADH 0,1 mM. As leituras foram feitas a 340 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos, utilizando o coeficiente de extinção molar de $6,2 \text{ mM cm}^{-1}$.

3 RESULTADOS

Ao pesar os vasos no final do experimento, observou-se redução gradativa do conteúdo de água, refletindo diretamente no potencial hídrico do solo e, por consequência, na disponibilidade de água para planta (TABELA 2).

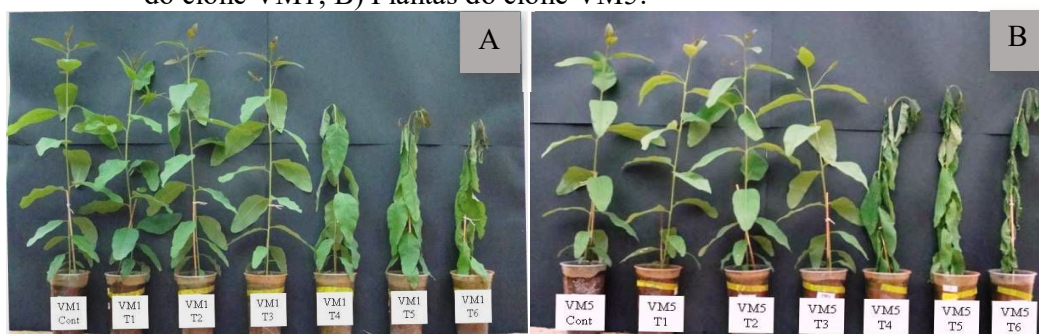
Tabela 2 - Peso dos vasos (PV), teor de água (A) e potencial hídrico do solo no momento das coletas (Ψ_w).

Tratamento	PV (g)		A (%)		Ψ_w (kPa)	
	VM1	VM5	VM1	VM5	VM1	VM5
Controle	903	908	50,50	51,33	- 0,75	- 0,68
T1	851	842	41,83	40,33	- 1,90	- 2,10
T2	775	794	29,17	32,33	- 17,91	- 7,33
T3	735	752	22,50	25,33	< - 1500	- 500
T4	713	715	18,83	19,17	< - 1500	< - 1500
T5	697	697	16,17	16,17	< - 1500	< - 1500
T6	682	684	13,63	14,00	< - 1500	< - 1500
Resiliência	854	858	42,33	43,33	- 1,7	- 1,52

Fonte: Do autor (2019).

Observando as imagens das plantas no momento da pesagem, é possível verificar que abaixo de 19,17% de umidade (T4) as plantas começaram a apresentar murcha visual, com sintomas proeminentes nos tratamentos T4, T5 e T6 em ambos os clones (FIGURA 2).

Figura 2 - Aspecto visual das plantas dos dois clones contrastantes (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus camaldulensis*), ao longo do experimento de déficit hídrico. A) Plantas do clone VM1; B) Plantas do clone VM5.

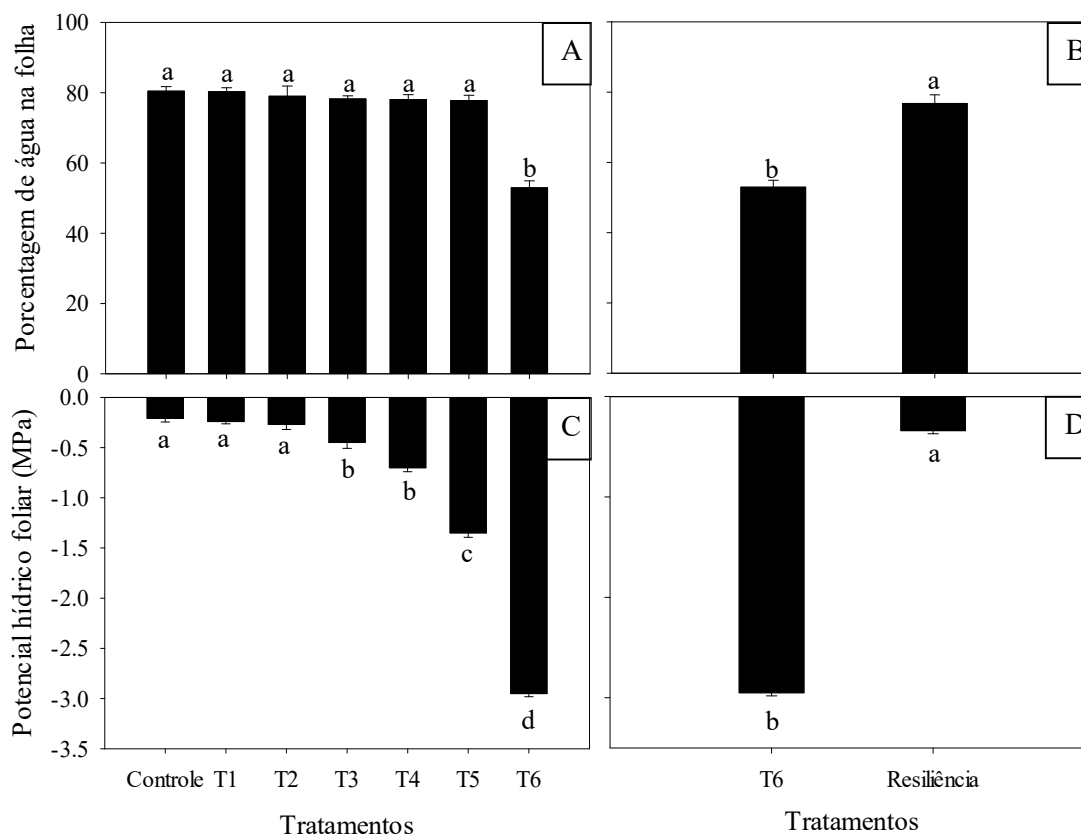


Fonte: Do autor (2019).

3.1 Porcentagem de água na folha e potencial hídrico foliar

Quanto a porcentagem de água nas folhas e ao potencial hídrico foliar, a análise de variância revelou diferenças significativas apenas entre os tratamentos. Mostrando redução significativa do conteúdo de água no tecido foliar nas plantas que ficaram por seis dias sem irrigação (FIGURA 3A e 3B).

Figura 3 - Porcentagem de água na folha dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico (A) e após a reidratação (B); Potencial hídrico foliar dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico (C) e após a reidratação (D) durante 48h. Letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).



Fonte: Do autor (2019).

Após a reidratação as plantas recuperaram a turgescência apresentando porcentagem de água em torno de 80% (FIGURA 3B).

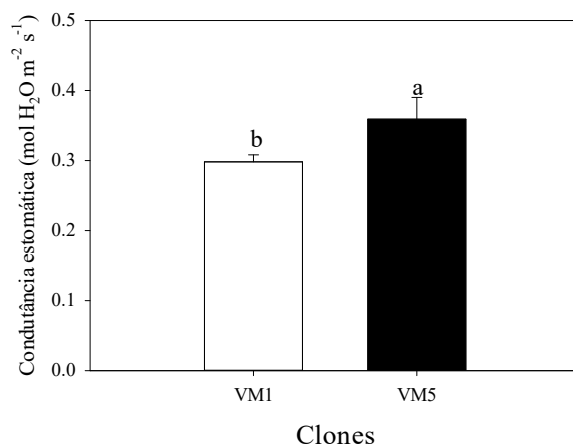
O potencial hídrico foliar (Ψ_w) alterou bastante com o passar dos dias, tendo alcançado valores entre -1,35 e -2,7 MPa nas plantas do grupo T5 e T6, respectivamente

(FIGURA 3C), não diferindo entre os clones VM1 e VM5. Semelhante à porcentagem de água nas folhas, o potencial hídrico foliar foi reestabelecido para valores próximos a zero, indicando aumento da hidratação das plantas (FIGURA 3D).

3.2 Trocas gasosas

Quanto às variáveis que compõem as trocas gasosas, foram observadas alterações significativas em todas elas. Para a condutância estomática foram observadas diferenças significativas entre os clones e entre os níveis de estresse, não verificando interação significativa entre os fatores. Quanto à resiliência verificou-se diferença significativa apenas entre os tratamentos, não constatando diferenças significativas entre os clones. Comparando os clones durante o período de estresse hídrico verificou-se maior g_s no clone VM5 (FIGURA 4).

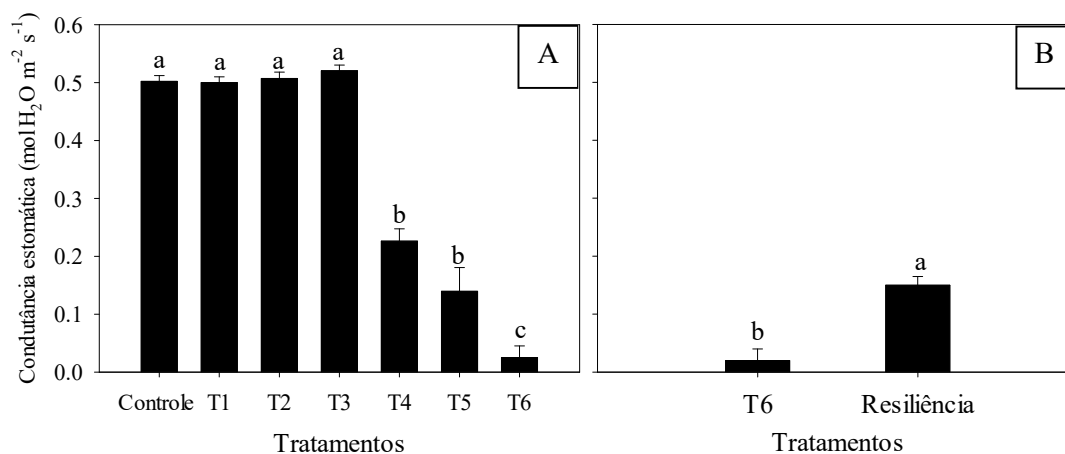
Figura 4 - Condutância estomática dos clones VM1 e VM5 submetidos a diferentes dias de déficit hídrico. As letras comparam os clones de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).



Fonte: Do autor (2019).

Para os níveis de déficit hídrico, observa-se que plantas com até três dias de déficit hídrico não apresentaram redução da g_s significativa em relação ao controle. Sendo observado redução significativa da g_s a partir do quarto dia da suspensão da irrigação, alcançando o mínimo nas plantas que ficaram por seis dias sem serem irrigadas (FIGURA 5A).

Figura 5 - (A) Condutância estomática dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Condutância estomática dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).



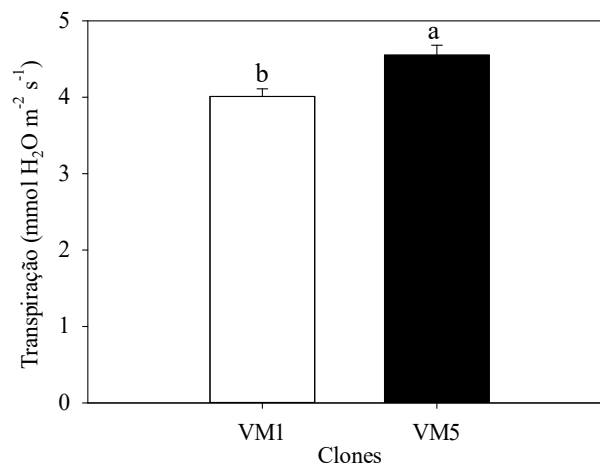
Fonte: Do autor (2019).

Nas plantas reidratadas a condutância estomática começou a ser reestabelecida, porém, as 48h não foram suficientes para voltar ao nível do controle apresentado na Figura 5A (FIGURA 5B).

Quanto à transpiração, não houve interação significativa entre os fatores estudados. No entanto, cada um dos fatores isoladamente interferiu de forma significativa nessa variável. No período de reidratação foi verificada interação significativa entre os fatores.

Sob déficit hídrico, verificou-se que o VM5 apresentou suas taxas transpiratórias significativamente superiores ao VM1 (FIGURA 6).

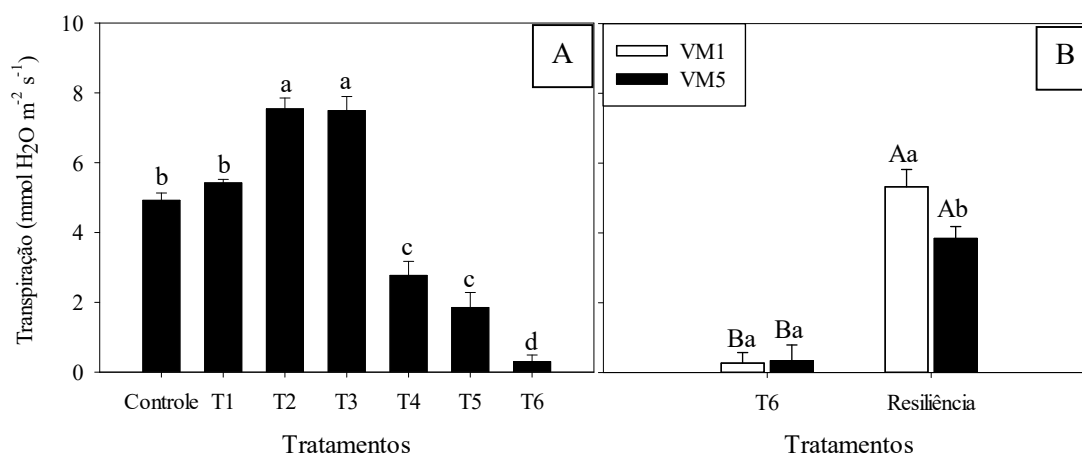
Figura 6 - Transpiração dos clones VM1 e VM5 submetidos A dias de déficit hídrico. As letras comparam os clones de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).



Fonte: Do autor (2019).

Ao observar as taxas transpiratórias em função dos níveis de déficit hídrico, verificou-se uma redução significativa a partir do quarto dia de déficit hídrico, chegando ao mínimo de $0,3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ quando submetida a seis dias sem irrigação (FIGURA 7A).

Figura 7 - (A) Transpiração dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Transpiração de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Em A, letras iguais não diferem os tratamentos, em B letras maiúsculas comparar os tratamentos dentro de um mesmo clone, enquanto que as letras minúsculas comparam os clones dentro de um mesmo tratamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).

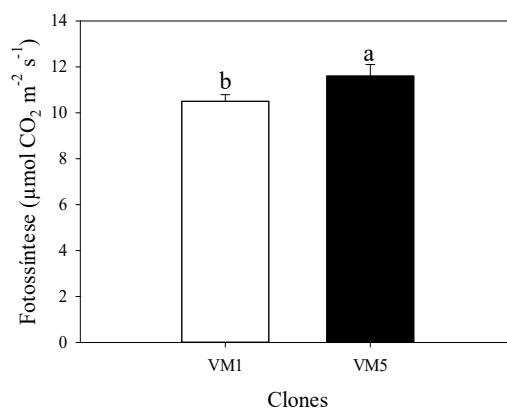


Fonte: Do autor (2019).

Durante o período de 48h de reidratação, fica notável que as plantas reidratadas apresentaram taxas transpiratórias maiores do que aquelas que ficaram seis dias sob déficit hídrico. Comparando os clones dentro de cada condição, observou-se que o VM1 reestabeleceu as taxas transpiratórias primeiro do que o VM5 (FIGURA 7B).

O clone VM5, por apresentar maior condutância estomática e maior transpiração, naturalmente, mostrou também maior fotossíntese em relação ao clone VM1 (FIGURA 8).

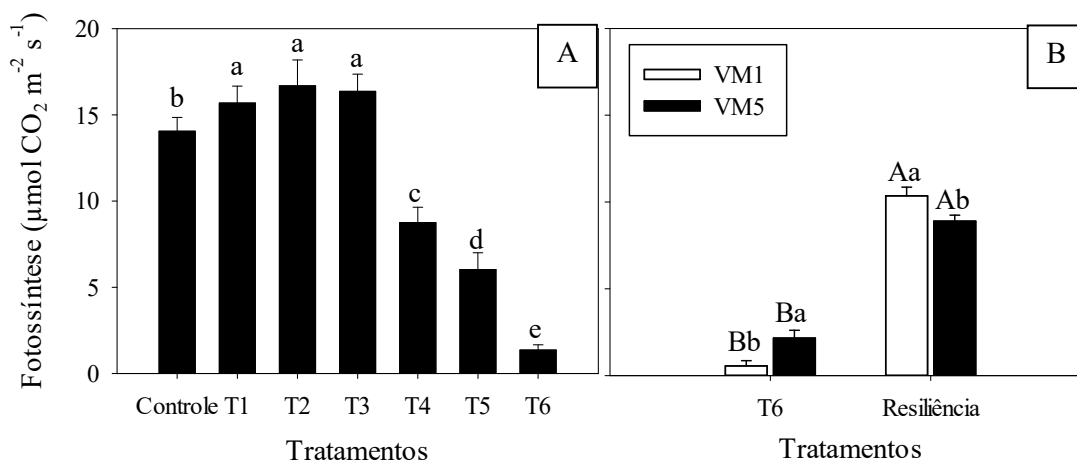
Figura 8 - Fotossíntese dos clones VM1 e VM5 submetidos ao déficit hídrico. As letras comparam os clones de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos tratamentos de déficit hídrico, o aumento gradativo do estresse ao longo dos dias causou reduções significativas na fotossíntese a partir do quarto dia sem irrigação, com destaque para o grupo de plantas com seis dias de déficit hídrico, onde foi observado redução em torno de 88%, quando comparada ao controle (FIGURA 9A).

Figura 9 - (A) Fotossíntese dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Fotossíntese de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Em A, letras iguais não diferem os tratamentos, em B letras maiúsculas comparar os tratamentos dentro de um mesmo clone, enquanto que as letras minúsculas comparam os clones dentro de um mesmo tratamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).

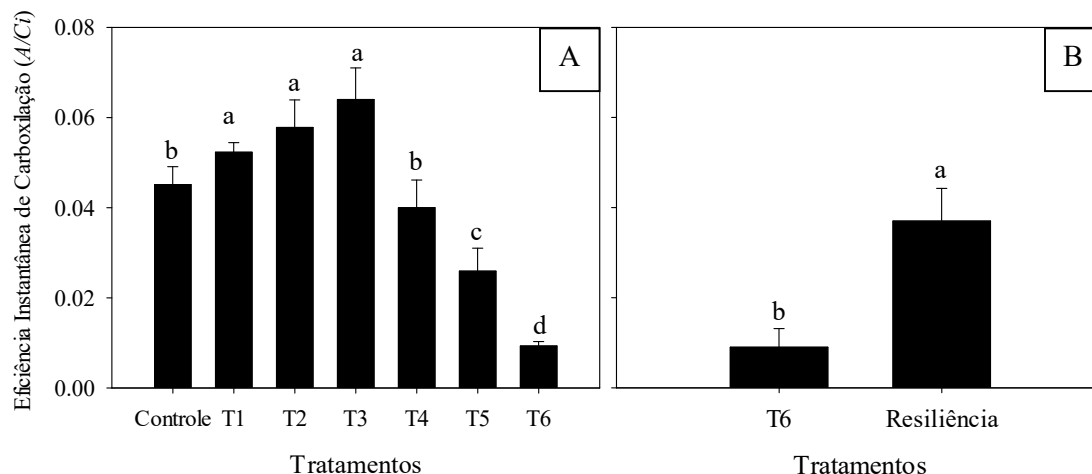


Fonte: Do autor (2019).

Assim como observado para condutância estomática e transpiração, a taxa fotossintética nas plantas reidratadas começaram a ser reestabelecidas, no entanto, o tempo de reidratação, 48h, não foi suficiente para que a fotossíntese retornasse ao nível de controle. Observou-se também, que o VM1 após a reidratação, apresentou taxas fotossintéticas mais altas do que VM5 (FIGURA 9B).

No trabalho apresentado, a eficiência de carboxilação máxima, nas devidas condições, foi alcançada por plantas com três dias de déficit hídrico (T3). Por outro lado, os menores valores para essa variável foram medidos em plantas com cinco e seis dias de déficit hídrico, destacando as plantas do grupo T6, que apresentaram redução de 79,37% em comparação com o controle (FIGURA 10A).

Figura 10 - (A) Eficiência Instantânea de Carboxilação (*EiC*) dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) *EiC* de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).



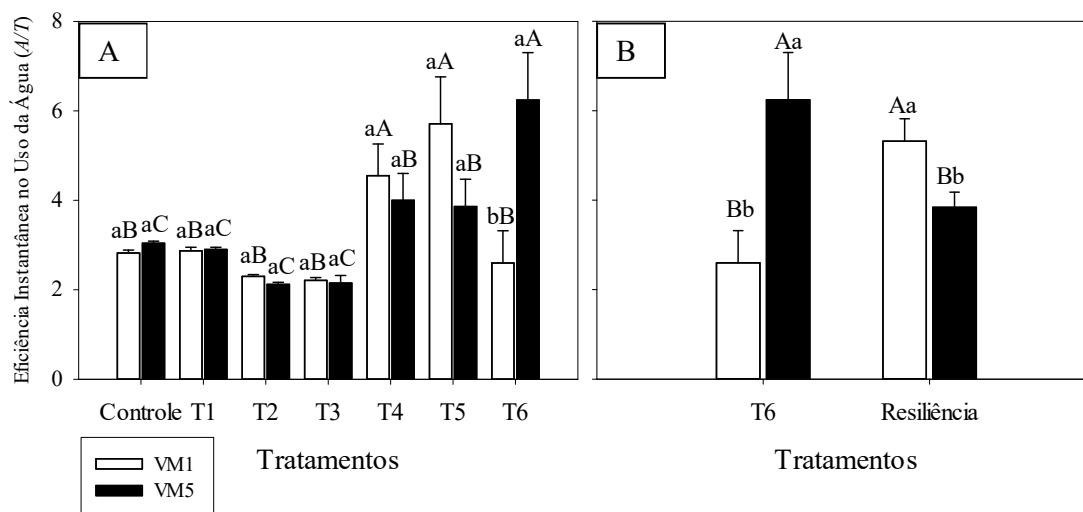
Fonte: Do autor (2019).

Para as plantas reidratadas não foram observadas diferenças significativas entre os clones, verificando que ambos os genótipos aumentaram significativamente a *EiC* quando foram reidratados (FIGURA 10 B).

Para a Eficiência Instantânea no Uso da Água (*EiUA*), foi observada interação significativa entre os dois fatores (Clones x Dias de déficit hídrico), tanto no período de imposição do déficit hídrico, quando após as 48h de reidratação. Ao observar separadamente todos os tratamentos do clone VM1 sob déficit hídrico, é possível destacar as plantas do grupo T4 e T5, por terem apresentado maior *EiUA* em relação às demais do mesmo clone. Para o clone VM5, as plantas do grupo T6 foram as que apresentaram maiores valores para essa mesma variável (FIGURA 11A).

Comparando-se os clones dentro de um mesmo tratamento, nota-se que no T6, o clone VM5 apresentou maior eficiência no uso da água do que o VM1 (FIGURA 11A).

Figura 11 - (A) Eficiência Instantânea no Uso da Água dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Eficiência Instantânea no Uso da Água de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A quanto em B, letras iguais não diferem os tratamentos, letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de um mesmo clone, enquanto que as letras minúsculas comparam os clones dentro de um mesmo tratamento de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).

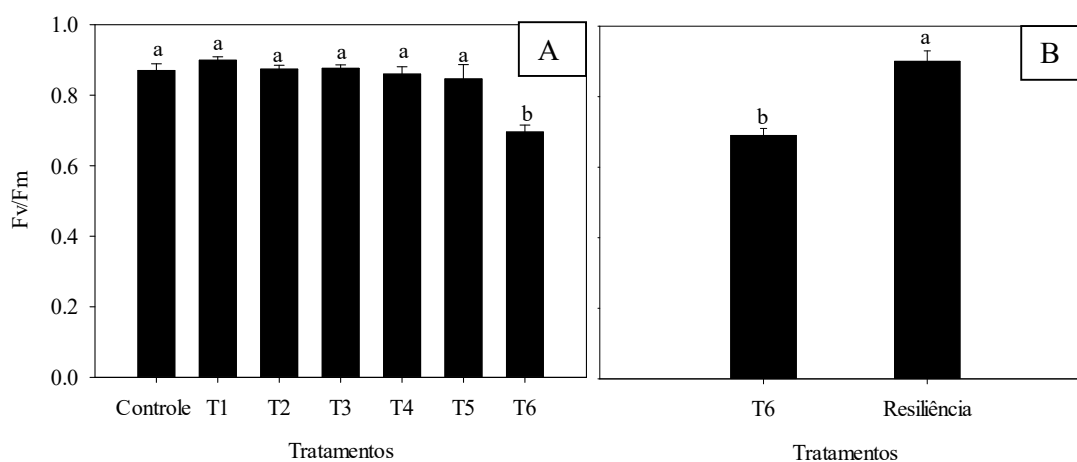


Fonte: Do autor (2019).

Quando as plantas foram reidratadas (Resiliência), verificou-se que, enquanto se recuperavam, as plantas do VM1 apresentaram maior *EiUA* do que o VM5 (FIGURA 11B).

O rendimento quântico da clorofila foi pouco alterado durante o período de déficit hídrico, apresentando redução apenas no nível mais severo de estresse (T6) (FIGURA 12A).

Figura 12 - (A) Rendimento quântico da fluorescência da clorofila a (Fv/Fm) dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Rendimento quântico da fluorescência da clorofila (Fv/Fm) de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão (n= 4).

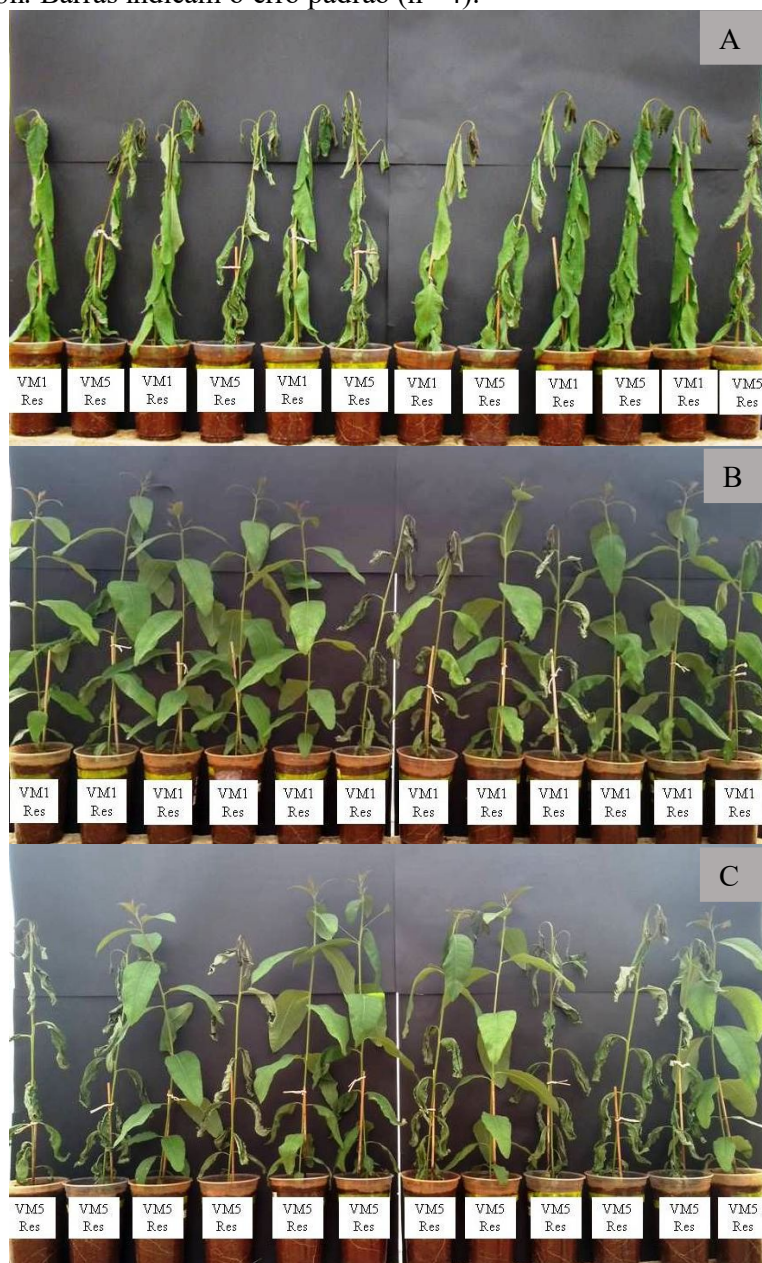


Fonte: Do autor (2019).

Após a reidratação por 48h, observou aumento da eficiência quântica nos dois clones, não havendo diferenças significativas eles (FIGURA 12B).

Como relatado anteriormente, corroborado pelo trabalho de Silva *et al.* (2016), as plantas do clone VM1 apresentam maior capacidade de manutenção do status hídrico em condição de déficit hídrico, embora seja menos produtiva. A maior capacidade do status hídrico e da recuperação do clone VM1, após um evento de seca, pode ser mostrado na Figura 13.

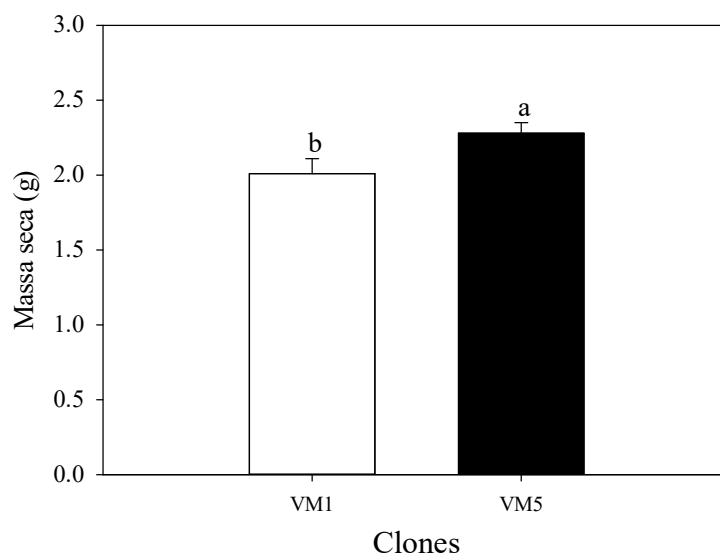
Figura 13 - Plantas dos clones VM1 e VM5 com seis dias de déficit hídrico (A), plantas do clone VM1 (B) e do VM5 (C) após seis dias de déficit hídrico reidratadas por 48h. Barras indicam o erro padrão (n= 4).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto ao acúmulo de biomassa foi possível observar que o clone VM5, disponibilizou mais ou moléculas de CO_2 para o acúmulo de massa seca do que o VM1 (FIGURA 14).

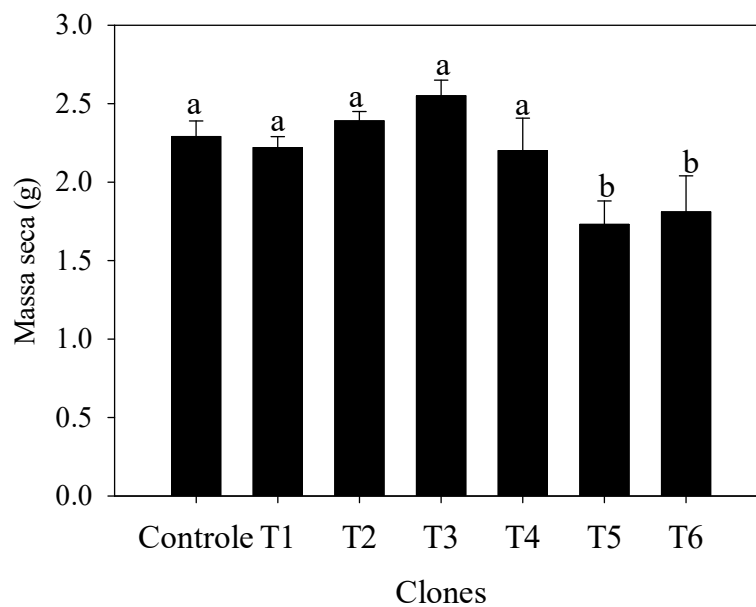
Figura 14 - Massa seca por planta dos clones VM1 e VM5 submetidos ao déficit hídrico. As letras comparam os clones de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos níveis de déficit hídrico, foi observada diferença significativas apenas no 5º e 6º dia de déficit hídrico, com esses grupos de plantas apresentando massa inferior a 2 g. Enquanto que todos os outros tratamentos, apresentaram massa superior a 2 g (FIGURA 15).

Figura 15 - Massa seca de dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico. Letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).

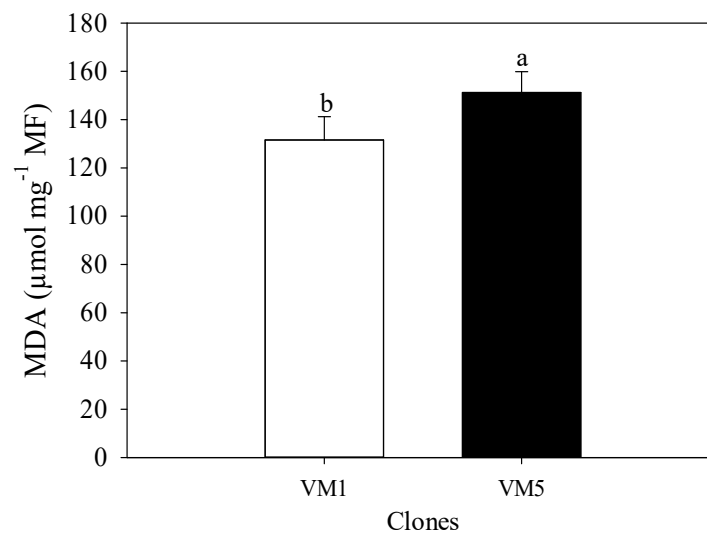


Fonte: Do autor (2019).

3.3 Análises bioquímicas

Quanto à peroxidação lipídica a análise de variância revelou efeito dos fatores de forma individual, não mostrando interação significativa entre eles. Quando se comparou os clones, o VM5 apresentou maior concentração de malondialdeído, mostrando assim, maior peroxidação lipídica das membranas celulares (FIGURA 16).

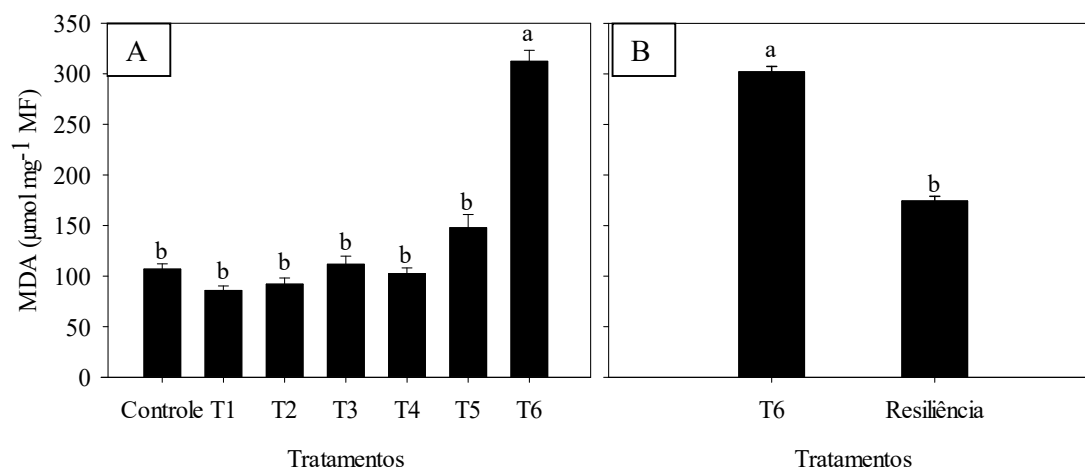
Figura 16 - Quantificação de malondialdeído (MDA) em folhas dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos ao déficit hídrico. As letras iguais não diferem os clones de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos níveis de estresse, verificou-se que nas plantas com seis dias de déficit hídrico, a peroxidação lipídica foi maior do que em plantas com menos dias de estresse (FIGURA 17A).

Figura 17 - (A) Quantificação de malondialdeído (MDA) em folha dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Quantificação de malondialdeído (MDA) em folha de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).

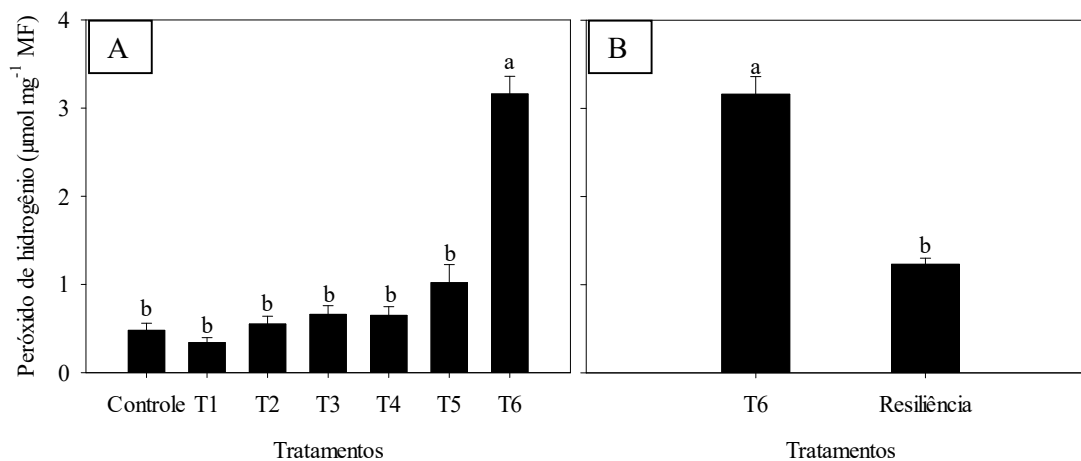


Fonte: Do autor (2019).

Quanto à resiliência, foi observado redução do conteúdo de MDA, nas plantas que foram reidratadas por 48h, quando estas são comparadas com aquelas que ficaram seis dias sob restrição hídrica, não verificando diferenças significativas entre os clones (FIGURA 17B).

Os resultados mostraram, que em plantas submetidas a seis dias de déficit hídrico consecutivos, os níveis de H₂O₂ foram significativamente maiores do que o controle, como também, do que nos tratamentos que ficaram menos dias sob estresse, que pode ser devido a um declínio na fotossíntese e/ou de outras alterações fisiológicas (FIGURA 18A).

Figura 18 - (A) Quantificação de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folha dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Quantificação de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folha de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).

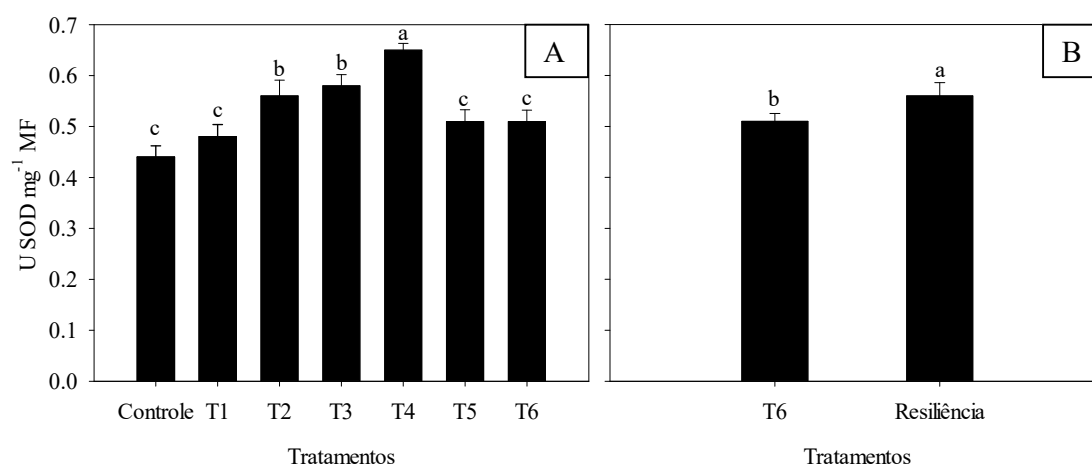


Fonte: Do autor (2019).

Durante o período de reidratação, não foram observadas diferenças significativas entre os clones, porém, foi verificado a redução de 58% no conteúdo de H_2O_2 nas plantas, independente dos clones, que passaram pelo período de reidratação (FIGURA 16B).

Para a SOD, não se observou diferenças significativas entre os clones, verificando-se diferenças entre os diferentes níveis de estresse, sendo possível observar maior atividade no T4, com valores alcançando $0,654 \text{ U SOD mg}^{-1} \text{ MF}$ (FIGURA 19A).

Figura 19 - (A) Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folha dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folha de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n=4$).

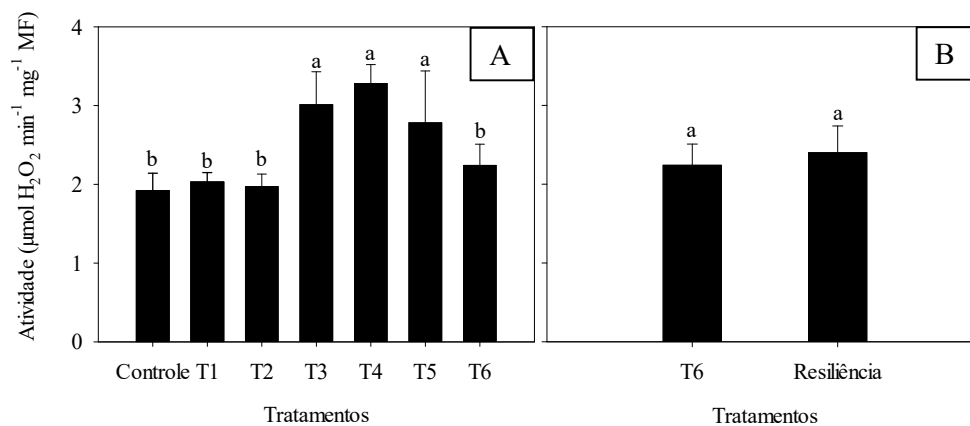


Fonte: Do autor (2019).

Quando analisou a atividade da SOD nas plantas reidratadas foi verificado um pequeno aumento em relação às plantas que ficaram seis dias sem serem irrigadas (T6) (FIGURA 19B).

Quanto à CAT, não foram observadas diferenças significativas entre os clones, nem tão pouco interação significativa entre os fatores. Pôde-se observar também um aumento progressivo a partir do T3 até o T4 (ponto de atividade máxima). Nessas condições, com 5 dias sem irrigação, a atividade da CAT começa a reduzir (FIGURA 20A).

Figura 20 - (A) Atividade da catalase (CAT) em folha dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos à sete níveis de déficit hídrico; (B) Atividade da catalase (CAT) em folha de plantas dos clones VM1 e VM5 em condições de estresse severo (T6) e após a reidratação (Resiliência) durante 48h. Tanto em A, como em B, letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n = 4$).



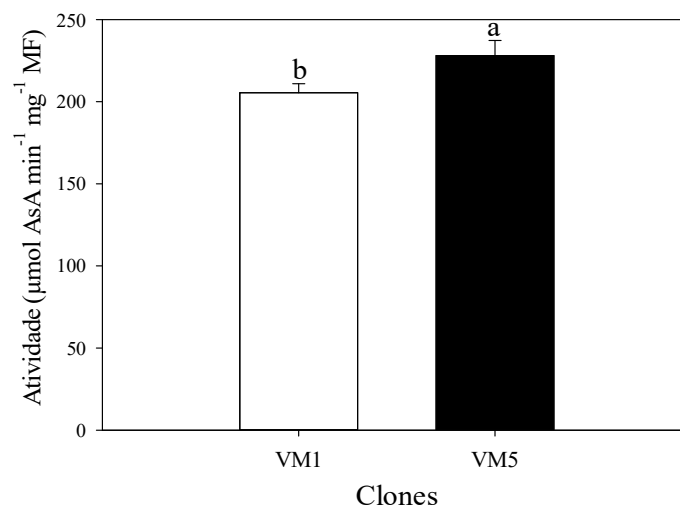
Fonte: Do autor (2019).

Atividade da CAT nas plantas da resiliência foi semelhante ao observado nas plantas do T6 (FIGURA 20B), que por sua vez, é semelhante ao observada nas plantas do controle (FIGURA 20A).

Para a MDHAR, os resultados estatísticos mostraram diferenças para os clones e para os tratamentos individualmente, no entanto, não houve interação entre eles.

Para os clones, o VM5 mostrou atividade da MDHAR cerca de 15% maior do que o VM1 (FIGURA 21).

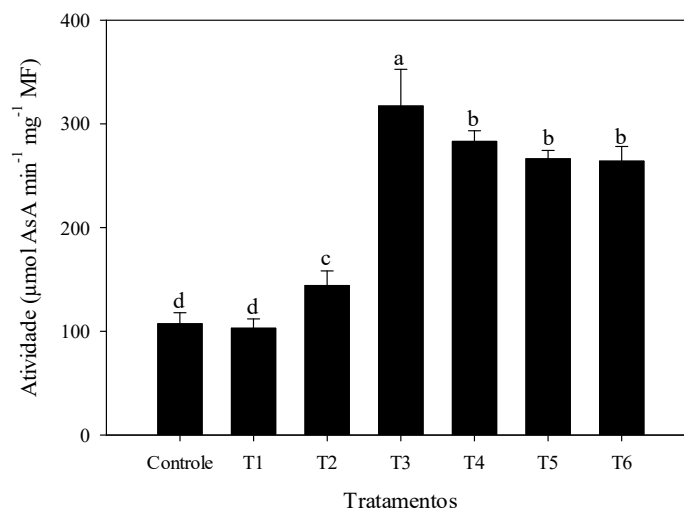
Figura 21 - Atividade da redutase do monodeidroascorbato (MDHAR) em folhas dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos ao déficit hídrico. As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos níveis de déficit hídrico, foi observado aumento significativo a partir do segundo dia da suspensão da irrigação, com o pico da atividade identificada no terceiro dia sem irrigação (FIGURA 22).

Figura 22 - Atividade da redutase do monodeidroascorbato (MDHAR) em folhas dos dois clones de eucalipto (VM1 e VM5) submetidos ao déficit hídrico. As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras indicam o erro padrão ($n= 4$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto à resiliência não foram apresentadas diferenças significativas para para nenhum dos fatores estudados, por conta disso, os dados não foram apresentados.

4 DISCUSSÃO

4.1 Condição hídrica do solo

O conteúdo de água no solo foi reduzido gradativamente à medida que passava os dias de déficit hídrico. Essa variável é utilizada na agricultura para muitas aplicações que incluem o planejamento da irrigação para o aumento da produtividade. Para não comprometer o desenvolvimento da planta, toda a água consumida pela evapotranspiração deve ser reposta sob a forma de precipitação ou irrigação, de forma a manter a umidade do solo ideal para que as plantas consigam retirar a quantidade de água necessária para o seu desenvolvimento (LEITE JR; FARIA, 2016). Quando não reposta em quantidade suficiente, a falta de água começa a interferir nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, culminando, muitas vezes, em perda de produtividade.

Sintomas visuais de déficit hídrico (Murcha foliar) foram observados a partir do 4º dia da suspensão da irrigação em ambos os clones. Em trabalho realizado anteriormente com os mesmos genótipos, foram observados sinais visuais de murchas apenas após 15 dias de imposição do déficit hídrico (MARTINS *et al.* 2018). O maior tempo para surgimento dos sintomas visuais das plantas no trabalho citado se deveu, principalmente, a dois fatores: utilização de substratos diferentes, como também a quantidade dos mesmos. Para o presente trabalho foram utilizados 600 g latossolo vermelho, enquanto que no trabalho de Martins *et al.* (2018), foram utilizados 1.500 g de substrato comercial.

4.2 Porcentagem de água nas folhas de potencial hídrico foliar

Foi possível observar redução no teor de água na folha em torno de 28% no grupo T6 quando comparado com os demais tratamentos, onde a porcentagem de água nas folhas permaneceu em torno de 80% (FIGURA 3A).

A porcentagem de água na folha é uma referência das condições hídricas nas plantas, particularmente durante períodos de seca, e à medida que se intensifica o déficit hídrico, a planta passa por uma desidratação do protoplasma, o que pode prejudicar os processos vitais de crescimento celular. Fato marcante aliado a esse processo é o aumento do extravasamento de eletrólitos, que pode ser intensificado pelo déficit hídrico. Tal fato pode resultar no aumento da fluidez das membranas, o que pode levar a uma fuga de eletrólitos dos

compartimentos celulares, comprometendo os processos vitais de funcionamento celular (LANGARO, 2014).

A porcentagem de água no tecido celular é importante, tendo em vista que esta participa de muitas reações químicas. Ressalta-se ainda que, com a desidratação dos tecidos de vegetais superiores, em geral, a morte da planta ocorre quando o conteúdo de água se situa em torno de 75% (PIMENTEL, 2004).

O potencial hídrico foliar (Ψ_w), ao contrário do que foi observado para a porcentagem de água nas folhas, alterou bastante com o passar dos dias, tendo alcançado valores entre -1,35 e -2,7 MPa nas plantas do grupo T5 e T6, respectivamente (FIGURA 3C), não diferindo entre os clones VM1 e VM5. No entanto, em trabalhos anteriores comparando os dois clones, observou-se maior manutenção do Ψ_w foliar em plantas do clone VM1, mantendo-o próximo de -0,8 Mpa, enquanto que para o clone VM5 foram encontrados valores de -1,75 Mpa, comprovando a existência de diferenças entre os dois clones quanto à tolerância ao déficit hídrico (MARTINS et al., 2018).

De acordo com a Figura 3C, é possível inferir que, mesmo com pouca variação no conteúdo de água no tecido foliar entre os tratamentos, o Ψ_w da folha variou bastante. Provavelmente, essa variação no potencial hídrico da folha ocorreu devido à variação no Ψ_w do solo, como observado na Figura 1. O sistema solo-planta-atmosfera funciona em equilíbrio, com a água fluindo do lugar de maior Ψ_w para o de menor. Dessa forma, com a redução do Ψ_w do solo, ocorre também alteração no Ψ_w foliar, haja vista que, para haver movimento de água no sentido solo-planta é necessário que o Ψ_w do solo seja maior do que o Ψ_w foliar.

4.3 Trocas gasosas

De maneira geral, verificou-se um efeito em cascata na fisiologia das plantas a partir dos primeiros sintomas da falta de água e que se tornou mais pronunciado a partir do quarto dia de déficit hídrico.

Durante da suspensão da irrigação, a transpiração acaba superando a velocidade de absorção de água pelas raízes provocando o déficit hídrico. Este então, altera, Dentre muitos fatores, a regulação do fechamento e abertura estomática, e, por consequência, a condutância estomática.

Plantas expostas ao déficit hídrico tendem a apresentar redução na condutância estomática (g_s), possivelmente, pelo aumento da síntese de ABA em condições de estresse

(VIRLOUVET; FROMM, 2015). Associações entre ABA e condutância estomática foram encontradas em trabalho com déficit hídrico em cana-de-açúcar, verificando-se menores valores de g_s em plantas com maiores concentrações de ABA e seus derivados (MARCOS *et al.*, 2018).

Quanto aos níveis de déficit hídrico, foram observadas reduções significativas de g_s nos grupos de plantas com quatro (54,94%), cinco (72,19%) e seis (96%) dias de déficit hídrico, com redução gradativa ao passar dos dias.

A resposta dessa variável ao estresse causado por modificações ambientais tem se mostrado bastante consistente na análise comparativa de mudas, podendo vir a ser tão pertinentes quanto dados isolados como, por exemplo, os de conteúdos relativo de água ou os de potenciais hídricos (FLEXAS; MEDRANO, 2002). Isso porque os estômatos desempenham um papel crítico na fisiologia das folhas, equilibrando a necessidade de CO_2 e o controle da perda de água pelas folhas (UTKHAO; YINGJAJAVAL, 2015).

A redução da condutância estomática é uma resposta inversa ao aumento da resistência às trocas gasosas realizadas pelos estômatos. O fechamento estomático em consequência da menor disponibilidade de água no solo provoca alteração em todos os mecanismos de trocas gasosas nas plantas. Além da condutância estomática, a transpiração, a fotossíntese e a concentração interna de carbono são fortemente alteradas pelo aumento da resistência às trocas de gases.

A transpiração reduzida em plantas sob déficit hídrico pode estar associada à alta sensibilidade estomática e ao menor ‘investimento’ nas folhas, possibilitando a manutenção ou pequena redução do conteúdo relativo de água nas folhas e hidratação razoável, suficiente para o metabolismo e crescimento (MATOS *et al.*, 2016).

Visto que o clone VM1 apresentou menor taxa transpiratória e menor condutância estomática, presume-se que este tenha uma melhor sensibilidade para sentir a falta de água e assim conseguir se proteger antes do VM5, evitando e/ou retardando os danos causados pelo estresse (FIGURA 6).

A redução nas taxas transpiratórias ao longo dos dias pode ser considerada uma redução bastante significativa, visto que o tratamento controle apresentou média de $5,12 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e o T6 $0,2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, apresentando redução em torno de 25 vezes (FIGURA 7).

A redução na taxa de transpiração com o aumento do déficit hídrico é uma das respostas observadas em plantas sob estresse e entende-se que essa é uma das alternativas adotadas para se evitar a perda de água, muito embora, em condições de estresse acentuado,

esse comportamento possa ocasionar o aumento da temperatura foliar e conseqüente morte dos tecidos (GALMES *et al.*, 2007). Em *E. camaldulensis*, foi relatado uma queda da taxa transpiratória aliada com queda nas taxas de condutância estomática, e essa interação aponta para uma estratégia que pode ser adotada pela espécie para evitar a perda de água (UTKHAO; YINGJAJAVAL, 2015).

De posse dos dados apresentados, é possível hipotetizar que os valores de fotossíntese também foram afetados negativamente em função do aumento do déficit hídrico, o que foi confirmado após a avaliação e análise dos dados de fotossíntese.

Assim como nas análises de trocas gasosas anteriores, não houve interação entre os fatores estudados, porém, individualmente, cada um dos fatores apresentou diferenças significativas entre os seus componentes. Comparando os clones, foi observado, assim como nas outras variáveis de trocas gasosas, maior taxa fotossintética no clone VM5 (FIGURA 9). Quanto aos níveis de déficit hídrico, foi observado redução significativa a partir do quarto dia da suspensão da irrigação, alcançando taxa fotossintética mínima de $2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, nas plantas que ficaram seis dias sem serem irrigadas.

Fotossíntese baixa está associada com menor acúmulo biomassa, o que é característica do clone VM1, confirmando a informação de que plantas mais tolerantes à seca, geralmente, tendem ser menos responsivas em condições ideais de irrigação, mostrando menor produção (FLORENÇA, 2004).

Em resposta às alterações na disponibilidade de água no solo e para continuar o seu desenvolvimento, as plantas possuem mecanismos que auxiliam à manutenção da homeostase celular e, assim, o funcionamento adequado das suas funções. Se tratando de trocas gasosas atrelado à redução da perda de água, as plantas tendem a fechar os estômatos e evitar a desidratação. No entanto, essa estratégia, naturalmente afeta a fotossíntese líquida causando redução de crescimento e outros efeitos em cascata. Dessa forma, as plantas que conseguem manter a fotossíntese em um nível ideal, mesmo com alta resistência estomática e baixa transpiração, possivelmente serão mais produtivas em condições de baixa disponibilidade hídrica, apresentando uma alta eficiência no uso água, como também na utilização do carbono disponível.

Aumento na eficiência do uso da água sob condições de déficit hídrico já foi demonstrado em *E. camaldulensis*, *E. brassiana* e *E. creba* (SILVA *et al.*, 2016). Esse aumento na *EiUA* é resultado de um mecanismo que visa permitir a sobrevivência das plantas sob condições estressantes (SILVA *et al.*, 2015).

A maior eficiência no uso da água do VM5 em relação ao VM1 no tratamento T6, pode ser atribuída ao fato de que, mesmo em condições severas, com condutância estomática e transpiração baixíssima o VM5 fotossintetizava mais do que VM1, acarretando numa maior relação A/E . Essa diferença, no entanto, não garante que VM5 seja mais tolerante ao déficit hídrico do que VM1. O que acontece é justamente o contrário, as plantas do VM1 como observado em muitos dos dados mostrados, sentem primeiro a falta de água, e mobilizam todas as estratégias possíveis para evitar a seca e, assim, como estratégia, reduzem a produção, com o objetivo de sobreviver e aguardar condições ideais para o pleno desenvolvimento.

A maioria das respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em condições de déficit hídrico buscam mitigar os efeitos do déficit hídrico, minimizando a perda de água e evitando a desidratação e/ou otimizando a sua aquisição, levando então, ao aumento da eficiência no uso da água (HODECKER, 2017). A $EiUA$, como indicador de ajuste em condições de déficit hídrico, é uma característica bastante avaliada e que, em geral, apresenta valores altos em espécies lenhosas adaptadas à seca (XU *et al.*, 2000).

Quanto ao rendimento quântico da clorofila a, o menor valor de Fv/Fm em plantas do grupo T6 pode estar relacionado com dano no aparato fotossintético. Em perfeitas condições, o aparato fotossintético das plantas apresenta eficiência quântica do PSII expressa como a razão de Fv/Fm , com valores entre 0,75 e 0,85 (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989). Valores abaixo de 0,40 foram encontrados por Silva *et al.* (2016) quando observaram o desempenho de clones do híbrido *Urograndis* submetidos ao déficit hídrico. Os autores justificam esses valores reduzidos em função da degradação dos componentes do PSII, dentre eles, a clorofila, tendo em vista que também foi observada redução nos teores desse pigmento.

Se tratando da resiliência, foi possível observar que após reidratação, enquanto 75% das plantas do clone VM1 recuperaram o aspecto de plantas hidratadas, apenas 50% das plantas do VM5 conseguiram recuperar plenamente. Além disso, é possível observar pelos aspectos das folhas, que as plantas do clone VM5 sentiram mais o déficit hídrico do que as plantas do VM1 (FIGURA 13).

4.4 Análises bioquímicas

Para o MDA, aumento de 14,39% do VM5 em relação ao VM1, indica que houve maior peroxidação lipídica no clone VM5 (FIGURA 14). Em plantas com seis dias de déficit hídrico, a peroxidação lipídica foi maior do que em plantas com menos dias de estresse, o que

pode ser confirmado pela maior concentração de MDA (194,33% de aumento) nas plantas do grupo T6 quando comparadas ao controle (FIGURA 15). Quanto às plantas da resiliência, a concentração de MDA foi reduzida em 42,33% em relação ao T6. No entanto, continuou apresentando concentrações maiores do que o controle.

Aumento na concentração de MDA também foi observado em experimentos com dois genótipos (AL-18 e Al-10) de *Eucalyptus globulus*, onde, após três semanas em condições de déficit hídrico, apresentaram 18 e 25% da capacidade de campo (Cc), foram encontradas diferenças significativas. Após retorno da irrigação, em apenas um dia foi possível observar decréscimo de MDA na condição de 25% da Cc. Por outro lado, as plantas em condições de 18% da Cc mantiveram as concentrações altas, precisando de uma semana para retornar ao nível do controle. Esses níveis mais altos de MDA, mesmo após a reidratação, podem indicar o reparo e a reconstrução das estruturas das membranas celulares (CORREIA *et al.*, 2014).

A exposição de plantas ao estresse hídrico geralmente resulta na geração de EROs como radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, causando danos oxidativos e alterando as funções celulares (FOYER; FLETCHER, 2001).

O H_2O_2 pode desempenhar papel como mensageiro secundário em situações de baixa disponibilidade hídrica, permitindo a sinalização para uma eventual condição de seca e, assim, a mobilização de todas as defesas da planta para tolerar essa condição, sobretudo a partir da ativação do complexo de enzimas antioxidantes. Porém, quando em concentrações elevadas o H_2O_2 pode provocar sérios danos às células (PONGPRAYOON *et al.*, 2013).

A atividade da SOD nos diferentes níveis de estresse, apresentou maior atividade no T4, onde alcançou valores de 0,654 U SOD mg^{-1} MF. A partir desse ponto, ocorreu uma redução da atividade dessa enzima, provavelmente devido a severidade do estresse. As alterações na atividade enzimática observadas entre os tratamentos mostram a importância da SOD em condições de estresse, podendo atuar como marcador bioquímico para plantas em estresse hídrico, devendo levar em consideração as possíveis oscilações da atividade enzimática em condições normais (ZHUN *et al.*, 2004).

Tendo em vista que a SOD é a primeira enzima do complexo enzimático e responsável por converter o radical superóxido (O_2^{-1}) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e que a CAT atua na decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (GUPTA *et al.*, 1993), já era esperado que essas duas enzimas apresentassem padrões de comportamento semelhantes. Uma vez que o produto da reação de uma enzima é substrato para a outra, a maior ou menor atividade da SOD reflete de forma direta no comportamento da CAT.

A catalase é uma das principais enzimas de eliminação de H_2O_2 . Essa enzima atua na dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , possuindo alta taxa de dissociação, sendo que uma molécula de CAT pode dismutar até 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto (GILL; TUTEJA, 2010). Portanto, a atividade da CAT é considerada indispensável para remoção de EROs em condições de estresse. Geralmente, condições ambientais estressantes são responsáveis pelo aumento da atividade da CAT (ZHUIJUN *et al.*, 2004; TONIN, 2005), entretanto, condições altamente estressantes podem acarretar alterações estruturais nas proteínas e levar à diminuição na taxa de atividade enzimática, o que caracterizaria sua degradação (BROETTO *et al.*, 2002).

A MDHAR no clone VM5 apresentou atividade em torno de 13,34% maior em relação a sua atividade no clone VM1. Em relação aos tratamentos, nota-se uma tendência de comportamento enzimático semelhante ao observado tanto para a SOD, quanto para a CAT, mostrando nos dias iniciais de déficit hídrico níveis relativamente baixos de atividade, quando comparado com os tratamentos que ficaram, no mínimo, três dias sob déficit hídrico (FIGURA 20).

A atividade da MDHAR, impulsionada pelo aumento do déficit hídrico, pode ser consequência da maior demanda por ácido ascórbico, importante antioxidante, com o intuito de proteger as células contra EROS (SWEETLOVE *et al.*, 2002). A ativação da MDHAR nas respostas à estresse já foram observadas em diversas plantas. Em tomate, por exemplo, resultou em aumento da tolerância ao frio (GILL; TUTEJA, 2010).

Como observado, em todos os dados que mostram a atividade das enzimas antioxidantes, a ação em conjunto de moléculas antioxidantes, enzimas ou não, são importantes, a fim de evitar danos oxidativos. No entanto, esse sistema é eficiente apenas em determinado ponto, pois, em certo nível do estresse, esse mecanismo de defesa não consegue mais proteger as plantas contra os danos oxidativos, e até mesmo a atividade dessas enzimas é reduzida (AJITHKUMAR *et al.*, 2014).

5 CONCLUSÃO

Os dados mostram que o clone VM5 apresenta características de crescimento melhores do que o VM1. No entanto, o VM1 apresenta maior capacidade de manutenção do status hídrico e resiliência do que o clone VM5.

A tolerância à seca em ambos os clones está correlacionada com ajustes em processos chave como a fotossíntese e o funcionamento dos sistemas antioxidantes. Entretanto, muitas questões permanecem sem resposta e estudos adicionais empregando uma análise combinada mais sofisticada do transcriptoma, proteoma e metaboloma, provavelmente serão de fundamental importância para fornecer uma compreensão holística dos mecanismos que conferem maior tolerância à seca.

REFERÊNCIAS

- AJITHKUMAR, I. P. *et al.* ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth under drought stress. **Cell Biochemistry Biophysics**, [S.l.], v. 68, p. 587–595, 2014.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, p.651-658, 1998.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. *et al.* Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. **British Ecological Society**, [S.l.], v. 3, p. 497-514, 1989.
- BROETTO, F.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Funcional Plant Biology**, [S.l.], v. 29, p. 13-23, 2002.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 52, p. 302-310, 1978.
- CORREIA, B. *et al.* Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 150, p. 580-592, 2014.
- CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**. v. 103, p. 551-560, 2009.
- FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, [S.l.], v. 89, p. 183-189, 2002.
- FLORENCE, R. G. **Ecology and Silviculture of Eucalypt Forest**. Australia, Collingwood: CSIRO, 2004. p. 413.
- FONSECA, S.M. *et al.* **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2010. 200 p.
- FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, [S.l.], v. 48, p. 115-120, 2001.
- GALMÉS, J. *et al.* Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachi minoricensis*. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 60, p. 308-317, 2007.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 59, p. 309–314, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, p. 909-930, 2010.

- GRATTAPAGLIA, D.; KIRST M. Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, [S.l.], v. 179, p. 911-929, 2008.
- GUPTA, A. S. *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 103, p. 1067-1073, 1993.
- HAVIR, E. A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 84, p. 450-455, 1987.
- HODECKER, B. E. R. *et al.* Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of Eucalyptus to water restriction. **New Forests**, [S.l.], v. 49, p. 173-195, 2018.
- HOSSAIN, M. A.; NAKANO, Y.; ASADA, K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen Peroxide. **Plant and Cell Physiology**, [S.l.], v. 25, p. 385-395. 1984.
- IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2017**. Brasília: IBÁ, 2017. p 15-39.
- LANGARO, A. C. *et al.* Alterações fisiológicas na cultura do tomateiro devido à deriva simulada de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 13, p. 40-46, 2014.
- LEITE JR., M. C. R. Utilização da irrigação no controle do potencial matricial de água no solo e sua influência na produtividade do cafeeiro. **Revista da Universidade do Rio Verde**, [S.l.], v. 14, p. 533-544, 2016.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators**, [S.l.], v. 30, p. 421-427, 1980.
- MARCOS, F. C. C. *et al.* Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 223, p. 9-18, 2018.
- MARTINS, G.S. *et al.* Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 229, p. 122-131, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 15, p. 473-497, 1962.
- OTTO, M. S. G. *et al.* Dominant clonal Eucalyptus grandis x urophylla trees use water more efficiently. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 328, p. 117-121, 2014.
- PIMENTEL, C. **A Relação da Planta com a Água**. Seropédica, RJ: EDUR, 2004.
- PONGPRAYOON, W. *et al.* The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regulation**, [S.l.], v. 30, p. 159-173, 2013.
- PYNGROPE, S.; BHOMIKA, K.; DUBEY, R. S. Reactive oxygen species, ascorbate-glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica

- rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. **Protoplasma**, [S.l.], v. 250, p. 585-600, 2013.
- ROCHA, M. D. G. D. B. et al. Seleção de genitores de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus urophylla* para produção de híbridos interespecíficos utilizando REML/BLUP e informação de divergência genética. **Revista Árvore**, [S.l.], v. 31, p. 977-987, 2007.
- SILVA, I. M. A. et al. Determination of parameters for selection of eucalyptus clones tolerant to drought. **African Journal of Agricultural Research**, [S.l.], v. 11, p. 3940-3949, 2016.
- SILVA, J. M.; ARRABAÇA, M. C. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C4 grass *Setaria sphacelata*: a comparison between rapidly and slowly imposed water stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 16, p. 551-555, 2004.
- SILVA, P. H. M. et al. Aplicação foliar de boro em eucalipto sob estresse hídrico. **Scientia Forestalis**, [S.l.], v. 43, p. 395-405, 2015.
- SILVA, P. H. M. et al. Seedling growth and physiological responses of sixteen eucalypt taxa under controlled water regime. **Forests**, [S.l.], v. 7. 2016.
- STRASSER, R. J. et al. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M. et al. (Ed). **Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation**. London: Taylor & Francis, 2000. p.443-480.
- SWEETLOVE, L. J. et al. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. **Plant Journal**, [S.l.], v. 32, p. 891-904, 2002.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TONIN, F. B. **Atividade de enzimas antioxidativas e absorção de silício em plantas de pimentão submetidas a estresse salino**. 2005. 93 p. Dissertação (Agronomia-Horticultura) - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP, 2005.
- UTKHAO, W.; YINGJAJAVAL, S. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. **Trees**, [S.l.], v. 29, p. 1581-1592, 2015.
- VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, [S.l.], v. 151, p. 59-66, 2000.
- VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, [S.l.], v. 205, p. 596-507, 2015.
- XU, Z. H. et al. Carbon isotope discrimination and oxygen isotope composition in clones of the F₁ hybrid between slash pine and Caribbean pine in relation to tree growth, water-use efficiency and foliar nutrient concentration. **Tree Physiol**, v. 20, n. 18, p. 1209- 217, Dec. 2000.

ZHUJUN, Z. *et al.* Silicon alleviates salt stress and increases antioxidants enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, [S.l.], v. 167, p. 527-533, 2004.

ANEXO A – TABELAS COM ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO RESPECTIVO EXPERIMENTO

Tabela 1 - Resumo da análise de variância e resultados médios das variáveis percentagem de água na folha (%A), Potencial hídrico foliar (ψ_w), Condutância estomática (G_s), Transpiração (E), Fotossíntese (A), Eficiência instatânea no uso da água ($EiUA$), Eficiência instantânea de carboxilação (EiC), Rendimento quântico da fluorescência da clorofila a (Fv/Fm), Massa seca (MS), Malondialdeído (MDA), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Dismutase do superóxido (SOD), Catalase (CAT), Monodeidro ascorbato redutase (MDHAR) em folhas de *Eucalyptus* submetidos ao déficit hídrico.

Fontes de variação	%A	ψ_w	G_s	E	A	$EiUA$	EiC	Fv/Fm	MS	MDA	H_2O_2	SOD	CAT	MDHAR
Clone (“F”)	0,59 ^{ns}	0,40 ^{ns}	5,67*	8,23*	2,62 ^{ns}	0,251 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,15 ^{ns}	5,08*	6,80*	1,46 ^{ns}	1,01 ^{ns}	0,09 ^{ns}	9,24**
VM1	75,19 a	- 0,85 a	0,31 b	4,18 b	10,84 a	3,29 a	0,04 a	0,84 a	2,01 b	123,14 b	0,93 a	0,50 a	2,47 a	201,22 b
VM5	75,88 a	- 0,91 a	0,37 a	5,28 a	11,70 a	3,45 a	0,04 a	0,84 a	2,26 a	150,60 a	1,03 a	0,51 a	2,45 a	225,03 a
Tratamento (“F”)	52,03**	56,09**	32,06**	54,69**	71,64**	5,30**	35,81**	11,94**	4,30**	16,62**	19,57**	3,54**	6,76**	73,66**
Controle	80,43 a	- 0,21 a	0,50 a	4,92 b	14,05 b	2,85 b	0,04 c	0,87 a	2,29 a	106,98 b	0,48 b	0,44 c	1,92 b	107,21 d
T1	80,27 a	- 0,24 a	0,50 a	5,42 b	15,68 a	2,89 b	0,05 b	0,89 a	2,21 a	85,78 b	0,34 b	0,48 c	2,03 b	110,93 d
T2	78,97 a	- 0,27 a	0,50 a	7,54 a	16,68 a	2,21 b	0,05 b	0,87 a	2,39 a	92,06 b	0,55 b	0,56 b	1,97 b	144,06 c
T3	78,20 a	- 0,45 b	0,52 a	7,49 a	16,36 a	2,18 b	0,06 a	0,87 a	2,55 a	110,65 b	0,66 b	0,58 b	3,01 a	317,14 a
T4	78,02 a	- 0,70 b	0,22 b	2,77 c	8,75 c	4,27 a	0,04 c	0,85 a	2,20 a	102,52 b	0,65 b	0,65 a	3,28 a	282,13 b
T5	78,74 a	- 1,35 c	0,13 b	1,85 c	6,03 d	4,78 a	0,02 d	0,84 a	1,73 b	147,77 b	1,02 b	0,51 c	2,78 a	266,30 b
T6	52,91 b	- 2,95 d	0,02 c	0,30 d	1,36 e	4,42 a	0,01 e	0,69 b	1,81 b	312,34 a	3,16 a	0,51 c	2,24 b	264,06 b
Bloco (“F”)	2,76 ^{ns}	2,75 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,07 ^{ns}	2,26 ^{ns}	0,95 ^{ns}	1,22 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,13 ^{ns}	1,86 ^{ns}	3,93 ^{ns}
Clone x Tratamento	0,28 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,98 ^{ns}	1,02 ^{ns}	2,14 ^{ns}	2,97*	2,23 ^{ns}	0,07 ^{ns}	2,29 ^{ns}	1,39 ^{ns}	1,38 ^{ns}	1,05 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,31 ^{ns}
C.V. (%)	4,14	7,26	4,04	11,66	17,71	14,34	12,09	6,64	16,93	17,85	13,55	11,19	24,38	13,75

** e *: significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, para os níveis de um mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$); C.V.: coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2019).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância e resultados médios das variáveis percentagem de água na folha (%A), Potencial hídrico foliar (ψ_w), Condutância estomática (*Gs*), Transpiração (*E*), Fotossíntese (*A*), Eficiência instantânea no uso da água (*EiUA*), Eficiência instantânea de carboxilação (*EiC*), Rendimento quântico da fluorescência da clorofila a (*Fv/Fm*), Malondialdeído (MDA), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Dismutase do superóxido (SOD), Catalase (CAT), Monodeidro ascorbato redutase (MDHAR) em folhas de *Eucalyptus* em condições de déficit hídrico e reidratadas.

Fontes de variação	%A	ψ_w	<i>Gs</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>EiUA</i>	<i>EiC</i>	<i>Fv/Fm</i>	MDA	H_2O_2	SOD	CAT	MDHAR
Clone ("F")	0,00 ^{ns}	0,10 ^{ns}	1,84 ^{ns}	13,30*	0,03 ^{ns}	2,82 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,05 ^{ns}	1,33 ^{ns}	4,46 ^{ns}
VM1	64,81 a	- 1,60 a	0,08 a	2,80 a	5,46 a	2,82 a	0,02 a	0,89 a	144,63 a	2,15 a	0,54 a	2,19 a	239,50 a
VM5	64,85 a	- 1,69 a	0,10 a	2,09 a	5,53 a	4,16 a	0,02 a	0,90 a	141,92 a	2,25 a	0,53 a	2,45 a	269,83 a
Tratamento ("F")	99,49**	104,55**	79,58**	480,70**	431,77 ^{ns}	4,65 ^{ns}	14,94**	15,08**	11,57**	29,16**	6,32*	0,47 ^{ns}	3,25 ^{ns}
T6	52,91 b	- 2,95 b	0,02 b	0,30 b	1,36 b	4,40 b	0,01 b	0,69 b	301,95 a	3,16 a	0,51 b	2,24 a	245,26 a
Resiliência	76,75 a	- 0,34 a	0,15 a	4,58 a	9,63 a	2,58 b	0,03 a	0,90 a	174,15 b	1,23 b	0,56 a	2,40 a	264,06 a
Bloco ("F")	4,73 ^{ns}	2,35 ^{ns}	2,21 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,16 ^{ns}	1,06 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,54 ^{ns}	1,34 ^{ns}	8,80*	0,04 ^{ns}	2,45 ^{ns}
Clone x Tratamento	0,22 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,10 ^{ns}	15,87*	14,63**	9,33*	1,31 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,22 ^{ns}	6,77*	2,20 ^{ns}	2,72 ^{ns}	0,86 ^{ns}
C.V. (%)	6,38	26,86	1,36	15,95	14,47	16,79	0,72	13,26	17,90	10,57	8,08	19,91	8,19

** e *: significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, para os níveis de um mesmo fator, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$); C.V.: coeficiente de variação.

Fonte: Do autor (2019).

CAPÍTULO 3 ACLIMATAÇÃO DE MUDAS DE EUCALIPTO À SECA POTENCIALIZADA PELA EXPOSIÇÃO PRÉVIA AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

Muitos trabalhos têm sido realizados considerando o estresse como um evento único. No entanto, em condições ambientais naturais sabe-se que episódios recorrentes de seca são bastante comuns. No presente trabalho, investigou-se os mecanismos de tolerância à seca em uma perspectiva mais ampla, objetivando-se verificar se mudas de eucaliptos expostas anteriormente à ciclos de déficit hídrico estarão mais aptas a tolerar outro evento de restrição hídrica, quando comparadas àquelas que nunca passaram por essa condição de estresse. Para tanto, o experimento foi dividido em duas etapas: na primeira, mudas com aproximadamente 15 cm de altura, cultivadas em tubetes de 56 cm³, foram divididas em 5 tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5). As plantas dos grupos T1 e T2 foram mantidas sempre irrigadas, enquanto que as dos grupos T3, T4 e T5 passaram por ciclos de estresse hídrico, com um, dois e três estresses semanais, respectivamente. Esse processo foi repetido por um período de três semanas. Na segunda etapa as mudas foram transferidas para sacos de mudas de 3 dm³, contendo 1,5 kg de solo e saturado com água. A partir desse momento, promoveu-se a suspensão da irrigação de todos os tratamentos, exceto o T1 que foi mantido sempre irrigado. Aos nove dias de déficit hídrico, as plantas principalmente do T2 e T3, se encontravam com sinais acentuados de estresse. As plantas que passaram pelos ciclos de estresse, em especial as dos tratamentos T4 e T5, conseguiram manter o potencial hídrico próximo ao do controle (T1). Quanto às variáveis que compõem as trocas gasosas, observou-se valores que indicam melhores condições de hidratação, principalmente nos tratamentos T4 e T5. O conteúdo de peróxido de hidrogênio e MDA foram significativamente reduzidos em função da exposição anterior ao déficit hídrico. Em consequência de alterações positivas das variáveis já citadas, as plantas dos tratamentos T4 e T5 conseguiram dobrar o tempo de sobrevivência em relação às plantas do T2. Os resultados obtidos demonstram que as plantas, quando expostas a múltiplos ciclos de déficit hídrico, ajustam o seu metabolismo, potencializando os mecanismos de defesa para responderem mais rápido e vigorosamente, em uma futura situação de seca.

Palavras-chave: *Eucalyptus*. Estresse abiótico. Silvicultura. Ciclos de estresse.

ABSTRACT

Many works has been done considering how stress is a unique event. However, under natural environmental conditions it is known that recurrent episodes of drought are quite common. In the present work, the mechanisms of drought tolerance were investigated in a broader perspective, aiming to verify if eucalyptus changes exposed before the cycles of water deficit will be better able to tolerate another event of water restriction, when compared to those that never they went through this stress condition. For this, the experiment was divided in two stages: in the first, seedlings with approximately 15 cm of height, cultivated in tubes of 50 cm³, were divided in 5 treatments (T1, T2, T3, T4, T5). Plants T1 and T2 were always irrigated, while T3, T4 and T5 plants were submitted to cycles of water stress, with one, two and three weekly stresses, respectively. This process was repeated for a period of three weeks. In the second stage, the seedlings were transferred to bags of seedlings of 3 dm³, containing 1.5 kg of soil and saturated with water. From that moment, irrigation was suspended from all treatments, except for the T1 that was always kept irrigated. At nine days of water deficit, the plants mainly of T2 and T3, already had marked signs of stress. The plants that underwent the stress cycles, especially those of the T4 and T5 treatments were able to maintain the water stress close to the control (T1). As for the variables that make up the gas exchanges, values indicating better hydration conditions were observed, mainly in the T4 and T5 treatments. The content of hydrogen peroxide and MDA were significantly reduced as a function of the previous exposure to the water deficit. As a consequence of positive changes in the variables mentioned above, the plants of the T4 and T5 treatments managed to double the survival time in relation to the T2 plants. The results show that plants, when exposed to multiple cycles of water deficit, adjust their metabolism, potentiating the defense mechanisms to respond faster and more vigorously, in a future drought situation.

Key words: *Eucalyptus* ssp. Abiotic stress. Forestry. Stress cycles.

1 INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Eucalyptus* são as espécies florestais mais amplamente plantadas em todo o mundo (FLYNN, 2010), principalmente devido ao grande número de espécies, alta adaptabilidade a solos e climas, ciclo curto em relação a outras espécies florestais, amplo conhecimento e tecnologia para o cultivo, como também pela enorme variedades de produtos que podem ser obtidos com o eucalipto (BRONDANI *et al.*, 2012).

Durante o ciclo de vida, essas plantas são expostas a variações ambientais, como mudanças bruscas de temperatura, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes e água. Cocomitante a esses fatores abióticos, as plantas também sofrem com ataques de patógenos e insetos. Para sobreviverem a essas adversidades, as plantas desenvolveram mecanismos elaborados, mediados por cascatas de sinalização e redes de transcrição de genes que respondem a estímulos ambientais (FU; DONG, 2013).

Sendo a seca, o estresse ambiental mais importante na agricultura, podendo ainda ser agravado com os efeitos das mudanças climáticas, torna-se imprescindível entender as respostas das plantas a esse tipo de estresse com o intuito de aumentar a produtividade das culturas, mesmo em condições de baixa disponibilidade hídrica (ATKINSON; URWIN, 2012).

Dentre os mecanismos que contribuem para a tolerância ao déficit hídrico, a redução da condutância estomática é o primeiro utilizado pela maioria das plantas, e assim, quando a resistência da perda de água é maior do que o fluxo do CO₂ na célula, ocorre aumento na eficiência do uso da água (GALLE *et al.*, 2011). Em climas tropicais, situações de déficit hídrico são geralmente acompanhados por excesso de radiação, levando ao aumento do dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio (EROs) (UZILDAY, 2012). Uma vez produzidas, as EROs podem ser neutralizadas por compostos não enzimáticos, como os carotenóides, ou por enzimas do complexo antioxidante, como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peróxidase do ascorbato (APX) (SÁNCHEZ-DÍAZ *et al.*, 2007). Quando não evitados, os danos oxidativos podem ser analisados pela quantificação do malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação dos lipídios na membrana (CAKMAK; HORST, 1991).

Os efeitos do déficit hídrico variam dependendo de vários fatores, dentre eles, a intensidade e duração do estresse, genótipo, estágio de desenvolvimento, como também de alterações deixadas por estresse anteriores (VIRLOUVET; FROMM, 2015). Essas alterações, também chamadas de ‘memória do estresse’, podem ser definidas como as modificações

estruturais, genéticas e bioquímicas, resultantes de uma exposição anterior ao estresse que permitem que as plantas ‘lembrem’ eventos ambientais passados, tornando-as mais tolerante quando submetidas a um novo estresse (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016). Embora os mecanismos que coordenam a memória do estresse em plantas não sejam claramente compreendidos, acredita-se que o acúmulo de sinalizadores e fatores de transcrição (SANTOS *et al.*, 2011), além de modificação epigenéticas, estejam conjuntamente associados promovendo o efeito de ‘memória’.

Estudos recentes têm mostrado que, quando as plantas são expostas anteriormente a um estresse, adquirem habilidades de responderem mais rápido e vigorosamente quando sofrerem novamente o mesmo estresse (WALTER *et al.*, 2011).

Tendo em vista a capacidade das plantas responderem mais rapidamente a eventos recorrentes do mesmo estresse e os problemas de mortalidade das mudas após o plantio, objetivou-se com este estudo, avaliar, se ciclos repetidos de déficit hídrico aliviam os efeitos da seca em mudas de eucalipto, tornando-as mais tolerantes ao déficit hídrico. Hipotetiza-se que possa haver aumento da tolerância a seca nessas plantas devido ao melhor uso da água e aumento da eficiência na neutralização das espécies reativas de oxigênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido em Lavras-MG (121° 14' 43 S e 44° 59' 59 W) sudeste do Brasil. Plantas de dois clones (VM1; VM5) do híbrido *E. urophylla* x *E. camaldulensis* foram estabelecidas *in vitro* e, em seguida, multiplicadas para obtenção do material vegetal necessário para o experimento de déficit hídrico.

Para a aclimatização na casa de vegetação, plantas com aproximadamente 3,0 cm de altura e raízes bem desenvolvidas foram inicialmente transferidas para bandejas de plásticos (342 x 240 x 115 mm) contendo vermiculita e protegidas com sacos plásticos para a manutenção da umidade por 15 dias, formando assim, uma miniestufa. Durante esse período, as plantas foram irrigadas e adubadas constantemente, o saco plástico foi aberto progressivamente através de cortes em suas laterais.

Em seguida, as plantas foram transplantadas para tubetes de 56 cm³ e conduzidos por 21 dias até iniciar o pré-tratamento.

2.2 Ciclos de estresse

Após três semanas de cultivo e aproximadamente 15 cm de altura, cada clone foi dividido em cinco tratamentos de 12 indivíduos. Os tratamentos T1 e T2 receberam irrigação durante todo o pré-tratamento, T3 sofreu estresse hídrico uma vez por semana, T4 dois estresses por semana e T5 três estresses semanais durante três semanas. Cada evento de seca (estresse hídrico) foi imposto pela suspensão total da irrigação até murcha visual no ápice das mudas (FIGURA 1).

Figura 1 - Plantas do clone VM1 (A) e VM5 (B) em condição de déficit hídrico (T4 e T5).

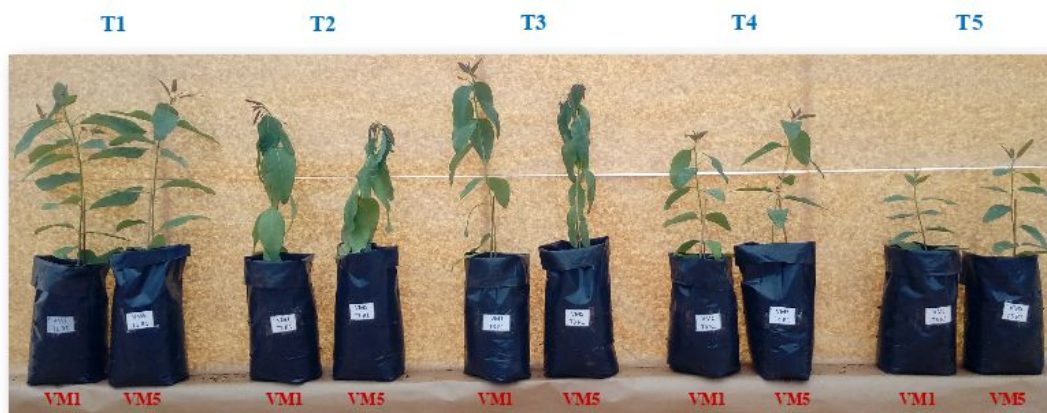


Fonte: Do autor (2019).

2.3 Imposição do déficit hídrico

Após os ciclos de estresse durante três semanas, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos contendo 1,5 kg de latossolo vermelho, seco e peneirado. Em seguida, todas as mudas foram irrigadas até que todo o substrato fosse saturado com água. A partir desse momento, os tratamentos T2, T3, T4 e T5 tiveram a irrigação completamente suspensa e o T1 (controle positivo) continuou sendo irrigado todos os dias, para que ao final do experimento fosse possível ter plantas em condições ideais de irrigação para contrapor com as plantas que passaram pelos ciclos de déficit hídrico e as que não passaram. As análises e coletas foram realizadas quando foram identificadas as primeiras plantas com murcha acentuada do ápice caulinar (FIGURA 2).

Figura 2 - Condições em que as plantas se encontravam no momento das coletas.



Fonte: Do autor (2019).

2.4 Coleta de dados

2.4.1 Potencial hídrico foliar

O potencial hídrico das plantas foi determinado a partir da coleta de folhas expandidas, e a avaliação utilizando-se bomba de Scholander. As leituras foram realizadas do período de 04:00 a 06:00 horas da manhã e os resultados expressos em MPa.

2.4.2 Trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), a condutância estomática ao vapor d'água (g_s), a taxa transpiratória (E), concentração carbono interno (C_i), eficiência instantânea no uso da água ($EiUA - A/E$ - calculada relacionando a fotossíntese e transpiração) - eficiência instantânea de carboxilação ($EiC - A/C_i$ - partir das relações entre fotossíntese e concentração interna carbono) foram determinadas no terceiro par de folha a partir do ápice caulinar, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LICOR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições aconteceram entre 08:00 e 11:00 horas, em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1.200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e $380 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, temperatura e umidade ambiente.

2.4.3 Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm)

O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado com um fluorômetro portátil (Mini-PAM; Walz; Alemanha) e as medidas feitas nas mesmas mudas e folhas em que foram realizadas as análises das trocas gasosas. Para efetuar a avaliação, as folhas foram adaptadas ao escuro por um período de 30 minutos, utilizando-se pinças adequadas ao equipamento segundo metodologia proposta por Strasser *et al.* (2000). Determinou-se a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e eficiência quântica do fotossistema II, dada pela razão F_v/F_m . A fluorescência variável (F_v) é dada pela diferença entre F_0 e F_m .

2.4.4 Peroxido de hidrogênio

A quantificação de H₂O₂ foi realizada segundo a metodologia proposta por Velikova *et al.* (2000). Foram macerados 100 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 2,5 mM (pH 7,0) e iodeto de potássio (KI) 0,5 M. A concentração de H₂O₂ foi determinada pela absorbância das amostras a 390 nm, com base na curva-padrão de H₂O₂.

2.4.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (m/v) e homogeneizados em TCA 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi adicionada ao meio de reação contendo TBA 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v), incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos. A paralisação da reação ocorreu pelo resfriamento rápido em gelo e as leituras foram realizadas a 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento óptico = 1).

2.5 Enzimas do complexo antioxidante

Para as análises enzimáticas foram coletadas duas folhas completamente expandidas do terço superior de cada planta e imediatamente congeladas em N₂ líquido. O pool de amostras foi armazenado em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da extração.

A extração para a quantificação da atividade enzimática foi realizada conforme protocolo de Biemelt *et al.* (1998), sendo utilizado 0,2 g de cada amostra previamente triturada, as quais foram maceradas em N₂ líquido, utilizando cadinho e pistilo. Após a maceração foi adicionado às amostras, 1,5 ml de tampão de extração contendo fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), EDTA 0,1 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,01 M e 22 mg de PVPP. A amostra foi então centrifugada a 15.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado

e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para todas as análises foi utilizado o espectrofotômetro Epoch microplate, modelo Biotek. Para cada uma das 4 repetições biológicas, foi realizada uma triplicata técnica.

2.5.1 Dismutase do Superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Para tanto, uma alíquota de $10\text{ }\mu\text{L}$ dos extratos foi adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM , EDTA $0,1\text{ }\mu\text{M}$, NBT $75\text{ }\mu\text{M}$ e riboflavina $2\text{ }\mu\text{M}$. As placas com o meio de reação e as amostras foram iluminadas, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W e as leituras foram realizadas a 560 nm . A atividade foi dada em Unidade de SOD $\text{mg}^{-1}\text{ MF}$.

2.5.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada segundo metodologia de Havir e McHale (1987), em que $9\text{ }\mu\text{L}$ do extrato enzimático foram adicionados ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) previamente incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Imediatamente antes das leituras, adicionou-se o H_2O_2 ($12,5\text{ mM}$) para dar início a reação. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm , realizada de 15 em 15 segundos, por 3 minutos, monitorada pelo consumo de H_2O_2 e o coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM cm^{-1} .

2.5.3 Redutase do Monodeidroascorbato (MDHAR)

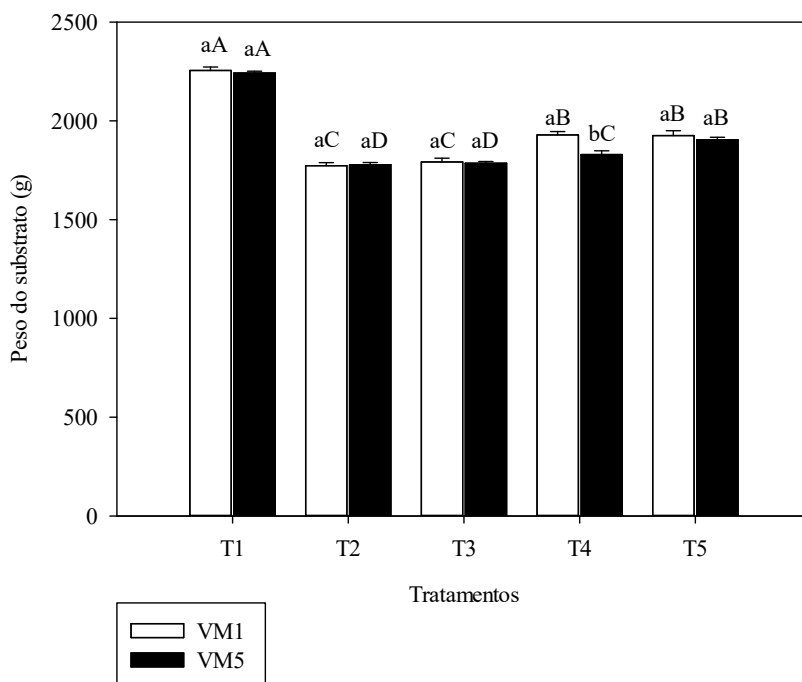
A atividade da MDHAR foi determinada de acordo com Hossain *et al.* (1984), pela redução da absorbância em função da oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Para tanto, uma alíquota de $20\text{ }\mu\text{L}$ do extrato enzimático foi adicionada ao tampão de incubação composto por Tris-HCl 50 mM , (pH 7,6), ascorbato $2,5\text{ mM}$ e água destilada. Imediatamente antes da leitura, foi adicionado NADH $0,1\text{ mM}$. As leituras foram feitas a 340 nm de 15 em 15 segundos durante 3 minutos utilizando o coeficiente de extinção molar de $6,2\text{ mM cm}^{-1}$.

3 RESULTADOS

3.1 Peso dos vasos e potencial hídrico

Ao final do experimento, todos os sacos com as plantas e o substrato foram pesados com a intenção de verificar se haveria diferenças significativas na evapotranspiração dos cinco grupos de plantas (FIGURA 3).

Figura 3 - Peso do substrato em que continha as mudas submetidas ao déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Barras com as mesmas letras minúsculas entre os clones, e maiúsculas para os tratamentos dentro dos clones, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



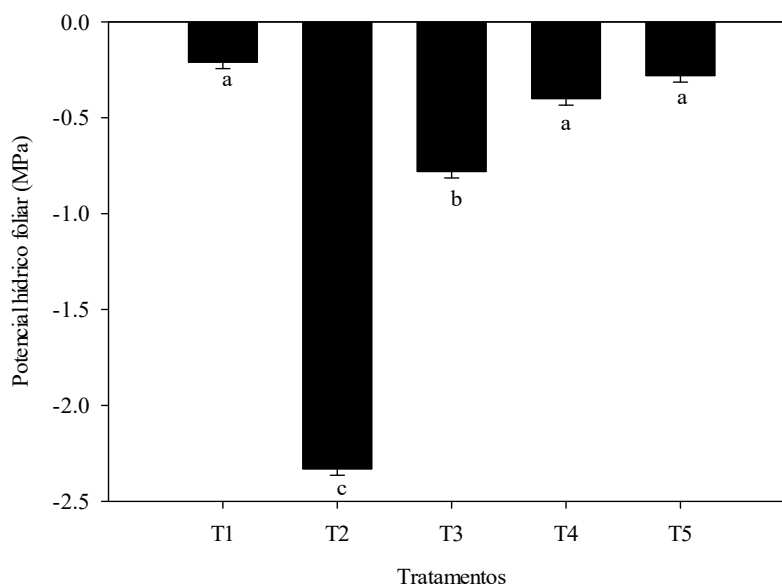
Fonte: Do autor (2019).

Foi observado que em todos os tratamentos, tanto o VM1, quanto o VM5, o conteúdo de água foi reduzido significativamente quando comparado às plantas que foram hidratadas durante todo o experimento (FIGURA 3).

Para o potencial hídrico foliar, a análise de variância revelou significância apenas para os ciclos de estresse, não apresentando diferenças significativas entre os clones, nem

interação significativa entre os fatores. Observa-se que o tratamento que não passou por nenhum estresse prévio (T2) apresentou valores de potencial hídrico extremamente baixos (-2,33 Mpa), reflexo de nove dias sem irrigação e da não passagem pelos ciclos de estresse. No entanto, com o mesmo período sem irrigação, plantas do grupo T3, T4 e T5, apresentaram potenciais hídricos mais altos, -0,78; -0,40; -0,28 Mpa, respectivamente (FIGURA 4).

Figura 4 - Potencial hídrico foliar dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras iguais não diferem os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

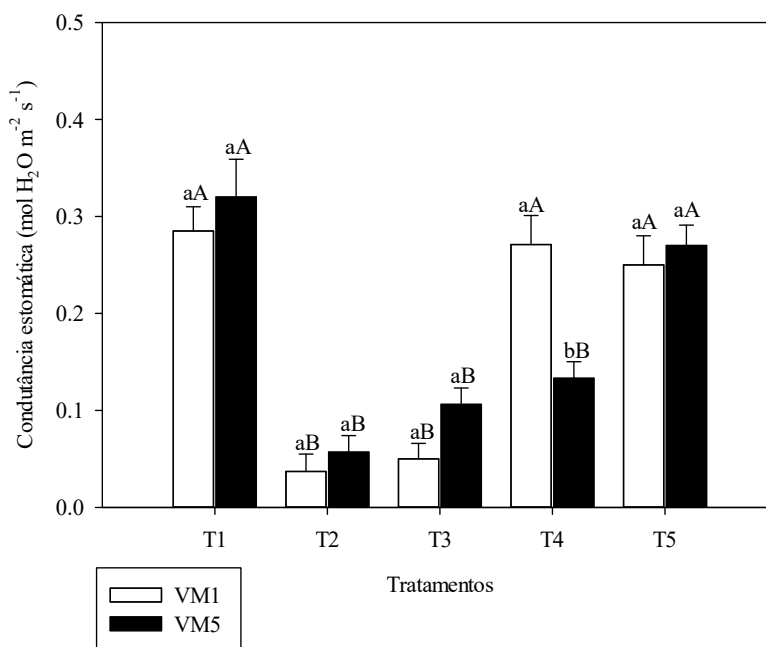


Fonte: Do autor (2019).

3.2 Trocas gasosas

A análise de variância mostrou interação significativa entre os fatores estudados (Clones x Ciclos de estresse). Quando se comparou individualmente cada tratamento, dentro de cada clone, foi possível observar no clone VM1 que as plantas dos grupos T4 e T5 apresentaram médias para condutância estomática semelhantes ao tratamento controle (T1), e as plantas do grupo T2 e T3 apresentaram condutância estomática abaixo do controle (T1), porém, semelhantes entre si. Quanto ao VM5 houve redução significativa nessa variável nos tratamentos T2, T3 e T4, atingindo valores médios de $0,0987 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ m}^{-1}$, e o T5 com média ($0,2845 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ m}^{-1}$) estatisticamente semelhante ao controle (FIGURA 5).

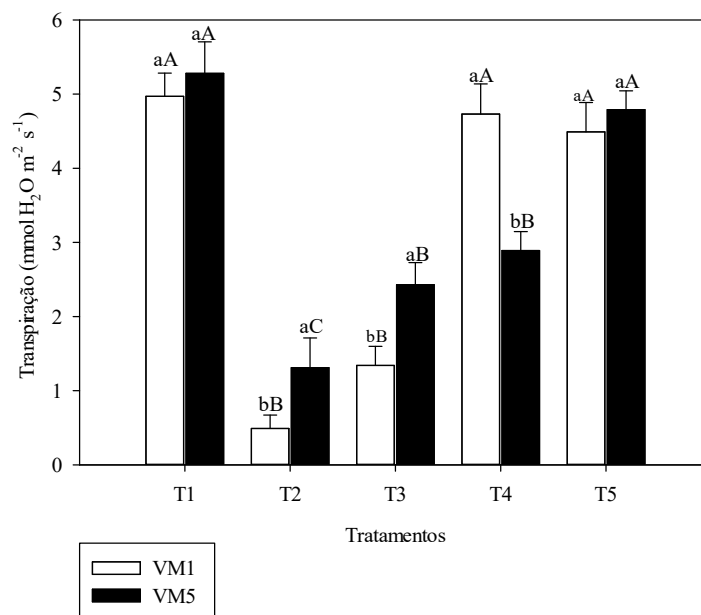
Figura 5 - Condutância estomática dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). Barras com as mesmas letras minúsculas entre os clones, e maiúsculas para os tratamentos dentro dos clones, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto à transpiração, também se observou interação entre os fatores, de modo que, quando se analisou o clone VM1 em cada um dos tratamentos, verificou-se que não houve diferença significativas entre as plantas do grupo T4 e T5 em relação ao controle. No entanto, plantas do grupo T2 e T3 apresentaram taxas transpiratórias inferiores ao controle, porém, semelhantes entre si. Para o clone VM5 verificou-se taxa transpiratória semelhante entre o T5 e o controle, com os outros tratamentos apresentando taxas transpiratórias estatisticamente inferiores. O T2 apresentando média de $1,2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, T3 $2,4 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e o T4 $2,8 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (FIGURA 6).

Figura 6 - Transpiração dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). Barras com as mesmas letras minúsculas entre os clones e maiúsculas para os tratamentos dentro dos clones, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

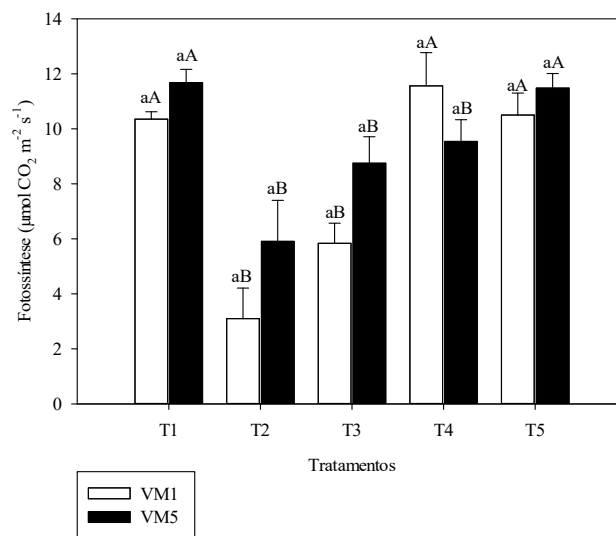


Fonte: Do autor (2019).

Comparando a transpiração dos clones dentro de cada tratamento, observou-se diferença significativa nos tratamentos T2, T3 e T4. Nos dois primeiros, o VM5 apresenta maior transpiração do que o VM1 e no T4 registra-se o VM1 com taxa transpiratória maior do que o VM5 (FIGURA 6).

Para a fotossíntese, também foi observada interação significativa entre os fatores, com os tratamentos T2 e T3 apresentando os menores valores para ambos os clones, e as plantas do grupo T4 e T5 com valores próximos ao controle (FIGURA 7).

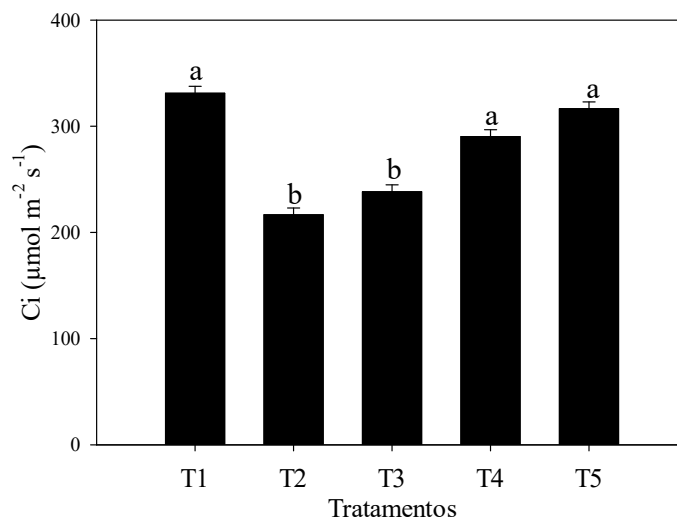
Figura 7 - Fotossíntese dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). Barras com as mesmas letras minúsculas entre os clones e maiúsculas para os tratamentos dentro dos clones não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto à concentração interna de CO₂, a análise de variância revelou significância apenas para o fator ciclos de estresses, não mostrando diferenças significativas entre os clones, como também não observando interação significativa entre os dois fatores. Quanto aos ciclos de estresses, foi constatada redução significativa nas plantas do grupo T2 e T3, quando comparadas a todos os outros três grupos de plantas, T1, T4 e T5 (FIGURA 8).

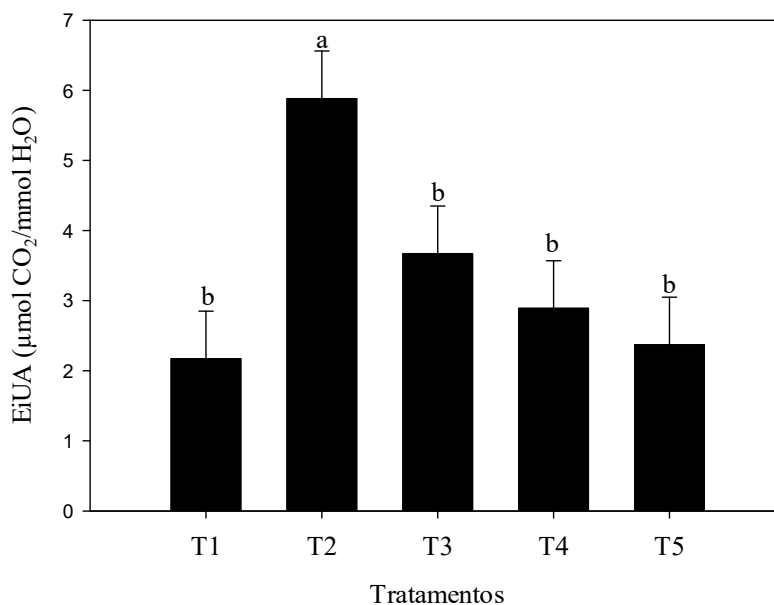
Figura 8 - Concentração interna de carbono (C_i) nos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Para a *EiUA* também foi encontrada diferença significativa apenas para os ciclos de déficit hídrico, não registrando diferenças entre os clones, nem interação significativa entre os fatores (FIGURA 8).

Figura 9 - Eficiência instantânea de eficiência no uso da água dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

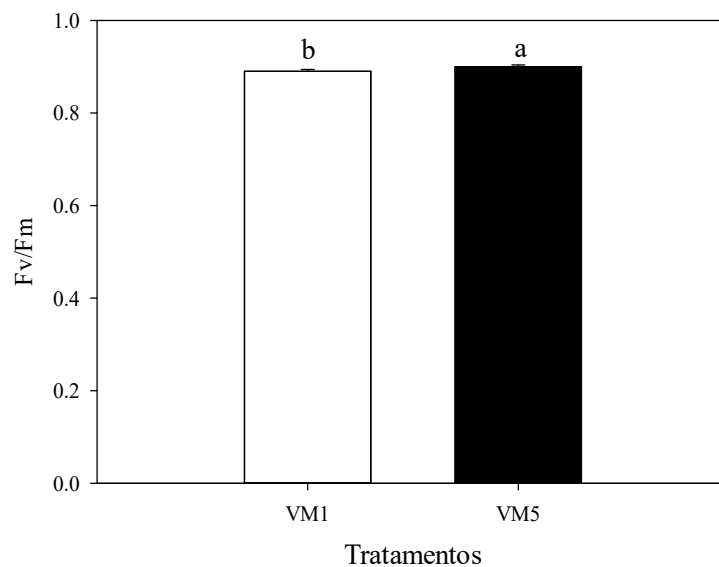


Fonte: Do autor (2019).

As plantas que não passaram por nenhum ciclo de estresse apresentaram, ao nono dia de déficit hídrico *EiUA*, maior do que todos os outros tratamentos, mostrando valores próximo à $6 \mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ (FIGURA 9).

A eficiência fotoquímica potencial dos clones é mostrada na Figura 10, na qual verifica-se que o VM5 apresentou significativamente maior rendimento quântico do que o VM1.

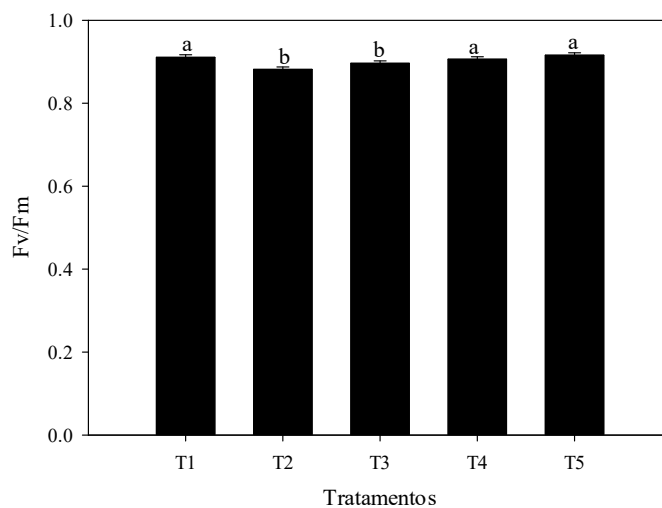
Figura 10 - Rendimento quântico da fluorescência da clorofila a (F_v/F_m) dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quando se analisou os tratamentos independente dos clones, observou-se redução significativa no grupo de plantas que não passaram pelos ciclos de estresse (T2) e nas plantas que passaram apenas por um ciclo de estresse (FIGURA 11).

Figura 11 - Rendimento quântico da fluorescência da clorofila a (F_v/F_m) dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanal (T4), três estresse semanal (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

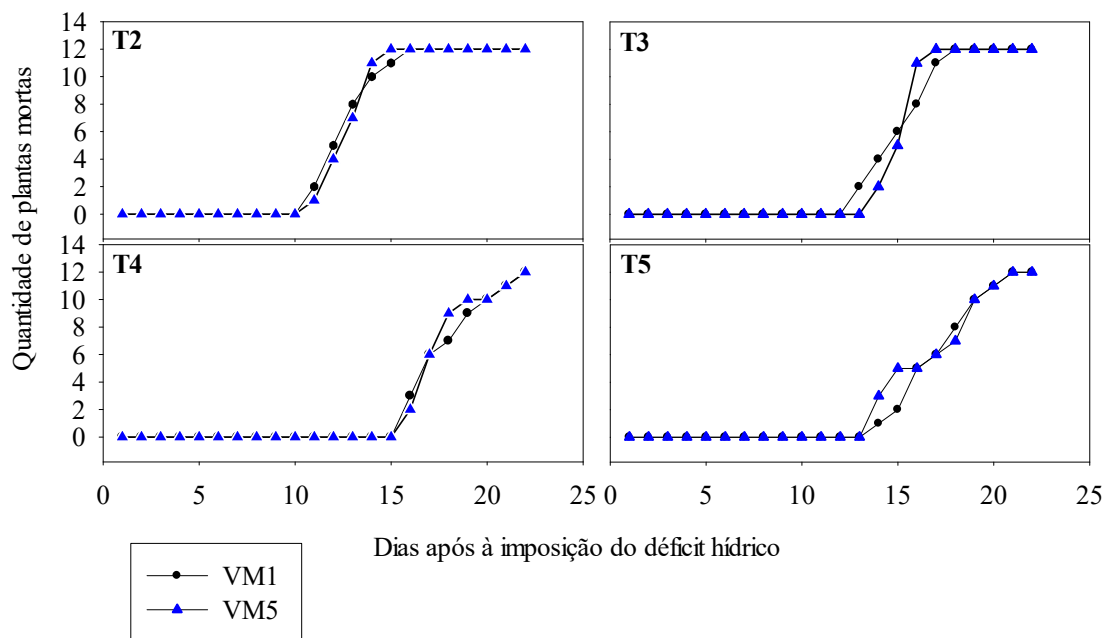


Fonte: Do autor (2019).

3.3 Mortalidade das plantas

A sobrevivência das plantas foi maior nos grupos de plantas que passaram pelos ciclos de estresse. Mais interessante ainda é que a sobrevivência foi maior com o aumento do número de estresse (FIGURA 12).

Figura 12 - Quantidade de plantas mortas após 22 dias de déficit hídrico. Plantas sem estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5).



Fonte: Do autor (2019).

Além da maior sobrevivência final das plantas ao longo dos dias, é possível visualizar que, enquanto no T2 as plantas começaram a morrer no 10º dia, nos tratamentos T4 e T5, a morte das plantas iniciou-se no 15º e 13º dia de déficit hídrico, respectivamente.

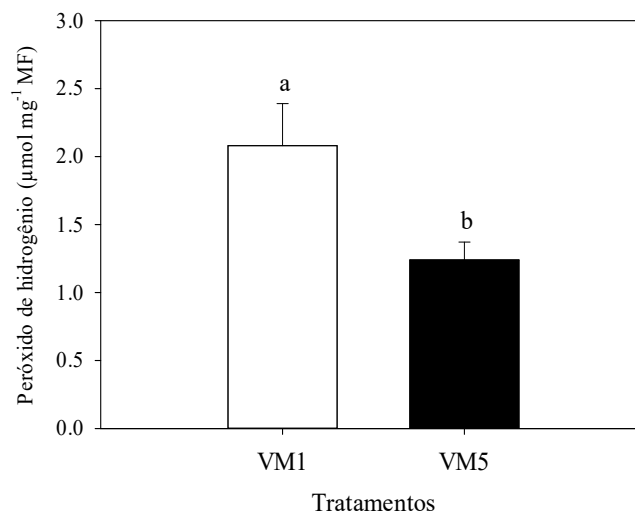
No décimo quinto dia todas as plantas do T2 estavam mortas, tanto as do VM1, como as do VM5. As plantas que conseguiram resistir por mais tempo, foram as do grupo T4 e T5, que sobreviveram por 22 dias, 7 dias a mais do que as plantas que não tinha passado por estresse anterior.

3.4 Análises bioquímicas

Para as análises de H_2O_2 os dados não mostram interação entre os fatores (Clones x Ciclos de estresse), apresentando significância individual para cada um dos fatores.

Verificando a diferença de concentração de H_2O_2 entre os clones, observou-se que no clone VM1 foi encontrado 40,38% mais H_2O_2 do que do VM5 (FIGURA 13).

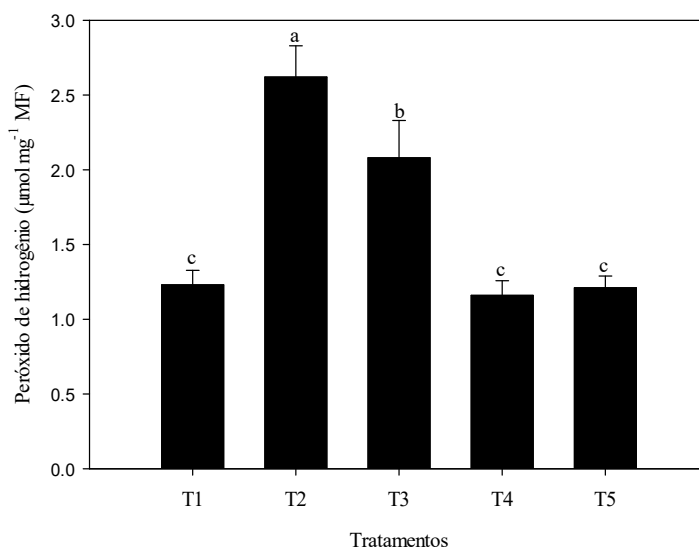
Figura 13 - Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Ao analisar os diferentes ciclos de déficit hídrico, observou-se aumento na concentração de H_2O_2 em 113% no T2 e 69,9% no T3 em relação ao T1. Nos tratamentos que receberam dois e três ciclos de déficit hídrico semanais não foram observadas diferenças significativas com o controle. Todavia, números maiores de ciclos de estresse foram eficientes para evitar o aumento da concentração de H_2O_2 (FIGURA 14).

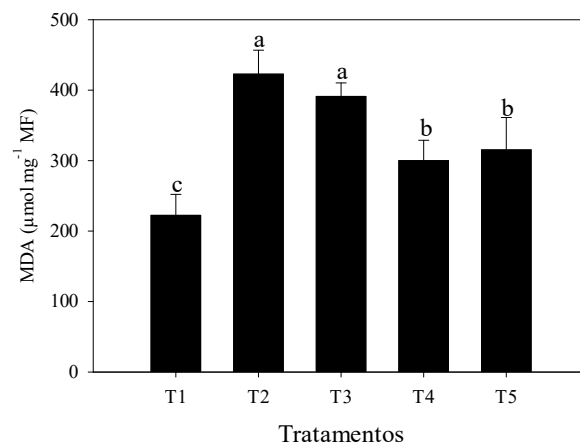
Figura 14 - Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Para o MDA foram observadas diferenças significativas apenas para fator ciclos de estresse, não verificando diferenças entre os clones e nem interação significativa entre os fatores. Foi observado aumento na concentração de MDA em todos os tratamentos que passaram pelo déficit hídrico, destacando os tratamentos T2 e T3 com concentração de MDA em torno de 93 e 82% respectivamente, acima do tratamento que estava sendo mantido irrigado (FIGURA 15).

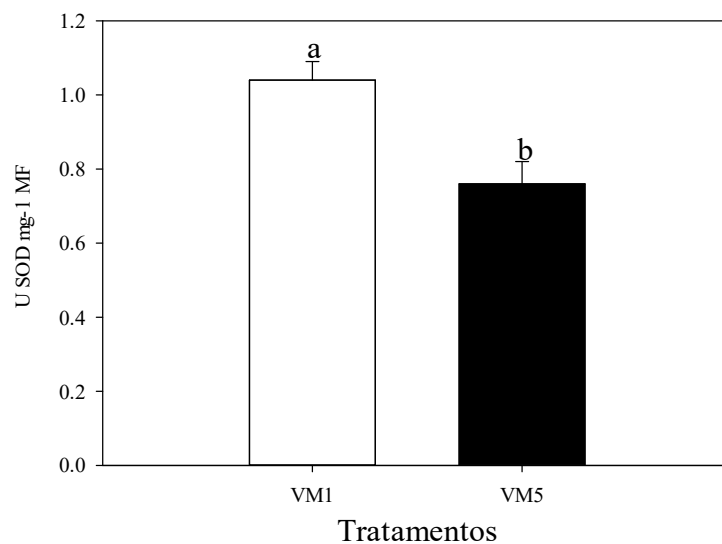
Figura 15 - Concentração de malondialdeído em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanal (T4), três estresse semanal (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto à atividade da SOD não se observou interação significativa entre os fatores estudados, havendo apenas significância individual em cada um dos fatores. Para os clones, nota-se que o VM1 apresentou atividade 20,02% maior do que o VM5 (FIGURA 16).

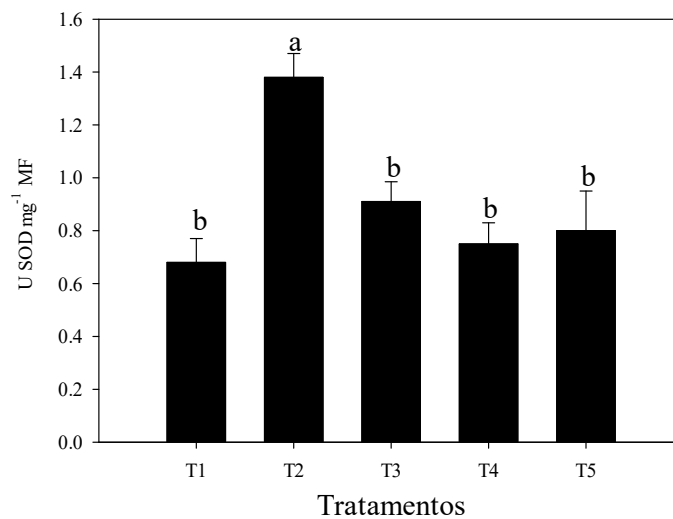
Figura 16 - Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD) em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos ciclos de estresse hídrico, verifica-se que as plantas que passaram pelo pré-tratamento mantiveram os níveis de atividade da SOD semelhantes ao T1.

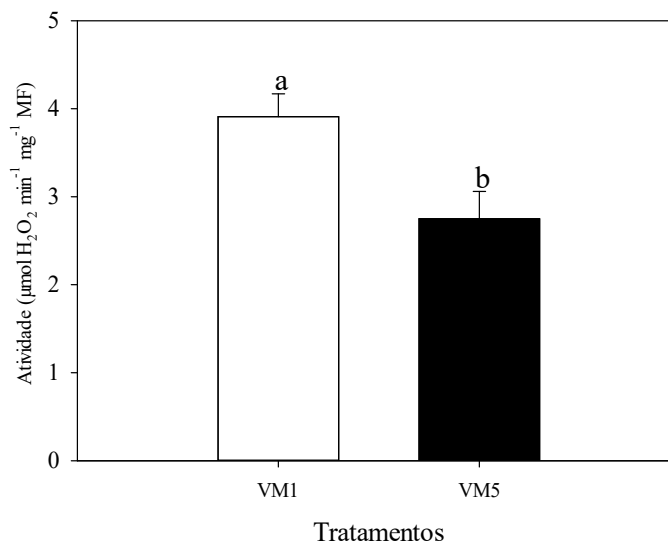
Figura 17 - Atividade da Dismutase do Superóxido (SOD) em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Varição semelhante à encontrada para a SOD foi observada na atividade da CAT, não apresentando interação significativa entre os fatores estudados. Para os clones foram encontrados, assim como observado na atividade da SOD, maiores atividades no clone VM1 (FIGURA 18).

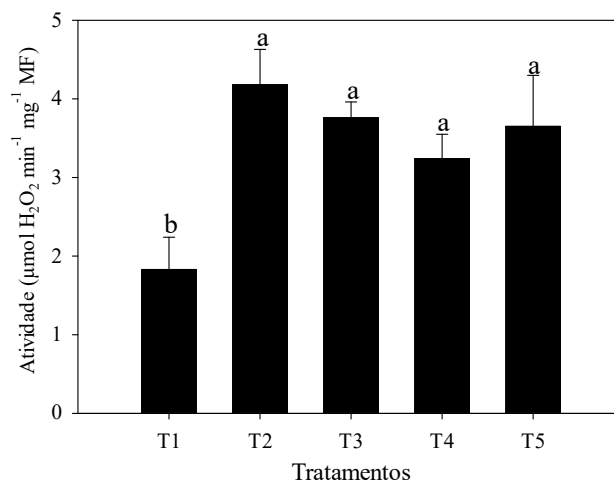
Figura 18 - Atividade da catalase (CAT) em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto aos ciclos de estresse, houve apenas diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle, não apresentando diferença estatística entre os diferentes ciclos de estresse (FIGURA 19).

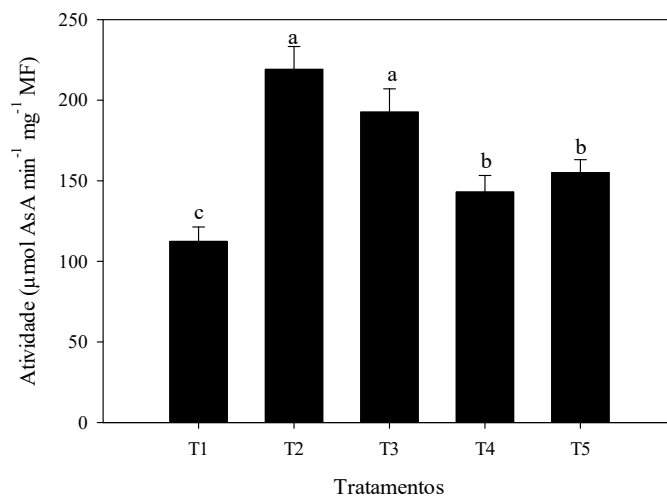
Figura 19 - Atividade da catalase (CAT) em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

Quanto à atividade da monodeidroascorbato redutase verificou-se aumento em todos tratamentos que sofreram déficit hídrico, porém, observa-se também que aqueles tratamentos que passaram por mais ciclos de estresses (T4 e T5), apresentaram menor atividade da MDHAR do que os tratamentos T2 e T3 (FIGURA 20).

Figura 20 - Atividade da monodeidroascorbato redutase (MDHAR) em folhas dos clones VM1 e VM5 submetidos ao pré-tratamento com déficit hídrico durante três semanas. Controle (T1), não sofreu estresse prévio (T2), um estresse semanal (T3), dois estresses semanais (T4), três estresses semanais (T5). As letras comparam os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Fonte: Do autor (2019).

4 DISCUSSÃO

4.1 Peso dos vasos e potencial hídrico foliar

Para os pesos dos vasos, de acordo com a análise de variância não há diferenças significativas dentro de cada tratamento isolado, entretanto, verifica-se interação significativa entre as fontes de variação. Analisando os clones individualmente em todos os níveis de déficit hídrico, nota-se para o VM1, que o T1 apresentou pesos dos vasos superiores aos demais, mostrando estar mais hidratado. Quanto aos outros tratamentos, o T2 e o T3 estavam com quantidade de água estatisticamente semelhante, porém, com umidade significativamente mais baixa dos que os tratamentos T4 e T5. Esses últimos se apresentavam com quantidade de água estatisticamente semelhante entre eles (FIGURA 3).

Quanto ao VM5, destaca-se o T1 com quantidade de água superior aos demais tratamentos. Os tratamentos que passaram por déficit hídrico apresentaram evapotranspiração semelhante, como exceção do T5, que manteve a umidade do solo superior aos demais (FIGURA 3).

A redução no potencial hídrico observada na Figura 3, em que plantas dos tratamentos T2 e T3 apresentam potenciais hídricos mais baixos do que os outros grupos plantas, correlaciona-se com a redução de água no substrato, uma que este acaba dificultando absorção de água, e assim, diminuindo o Ψ_w foliar. Nota-se ainda aumento gradativo do Ψ_w da folha com o aumento do número de estresses, mostrando a capacidade que as plantas possuem para ajustar o seu metabolismo a ponto de responderem mais rápido a um estresse no qual ela já havia sido submetida (MARCOS *et al.*, 2018).

4.2 Trocas gasosas

Os dados de condutância estomática condiz com o que foi observado no potencial hídrico, uma vez que, aqueles tratamentos com menor potencial hídrico apresentaram menor condutância estomática, provavelmente pelo fato dessas plantas estarem sinalizando a redução da umidade do solo e, assim, estimulando o fechamento dos estômatos que, por consequência, aumentou a resistência estomática e de forma inversa diminuiu a condutância estomática.

A redução da condutância estomática nas plantas do grupo T2 e T3 pode estar relacionada com o aumento da biossíntese do ácido abscísico (ABA), fitohormônio que induz o fechamento estomático (VIRLOUVET; FROMM, 2015). Em cana-de-açúcar, por exemplo,

foi encontrada relação inversa entre concentração de ABA e condutância estomática. No entanto, quando plantas de cana-de-açúcar foram expostas a três ciclos de secas, observou-se concentrações menores de ABA ao final do último ciclo. A menor concentração de ABA, provavelmente ocorreu em função de um melhor ajustamento no metabolismo para tolerar as condições de déficit hídrico. Esse ajustamento e/ou alterações podem ter sido causadas e potencializadas a cada ciclo de estresse, conferindo à planta maior tolerância ao déficit hídrico (MARCOS *et al.*, 2018).

As alterações na taxa fotossintética são controladas, dentre muitos fatores, pela resistência imposta pelos estômatos à trocas de moléculas de H₂O e CO₂, permitindo o aporte de substrato (CO₂) para Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase Oxigenase (RuBisCO), tornando possível a realização da fotossíntese adequadamente (TAIZ *et al.*, 2017).

Como observado, a baixa condutância estomática e a baixa transpiração, principalmente em T2 e T3 são resultados de uma situação de estresse enfrentada por esses grupos de plantas. Essa condição induz, dentre vários mecanismos, o fechamento estomático, que, por sua vez, provoca aumento da resistência à troca de gases reduzindo a desidratação. Porém, da mesma forma que o aumento da resistência estomática reduz a perda de água, ela também reduz a entrada de CO₂ na câmara subestomática disponibilizando menos carbono para a RuBisCO e, por consequência, reduz a assimilação de CO₂.

Além de influenciar a fotossíntese, a baixa condutância estomática reflete diretamente na entrada de CO₂ para a câmara subestomática. Uma vez que isso acontece, atrelado com a continuidade da fotossíntese, a concentração interna de carbono tende a diminuir. Tal fato é observado na Figura 8, em que mostra os tratamentos T2 e T3 com as menores concentrações de carbono interno entre todos os tratamentos.

A concentração de C_i é influenciada por fatores atmosféricos, podendo ser mediada pela interação desses fatores com a planta através dos estômatos, pela fotossíntese, condutância estomática e concentração externa de CO₂ (LAWSON *et al.*, 2014). Diversos tipos de estresses ambientais ocasionam a redução dos níveis de C_i . Essas alterações favorecem a formação de oxigênio reativo, o qual pode permanecer nesse estado por períodos curtos, podendo reagir com proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos e lipídeos (HATZ, 2007). Conseqüentemente, níveis de enzimas antioxidantes podem sofrer alterações para amenizar danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio.

A $EiUA$ mostra que, mesmo com a redução da fotossíntese a níveis baixíssimos, a $EiUA$ aumentou nas plantas do grupo T2. Esse aumento do $EiUA$ acontece uma função da baixa transpiração que evita a perda excessiva de água, aumentando assim a relação A/E

(FIGURA 9). Para os outros tratamentos, justifica-se menor *EiUA*, visto que a taxa fotossintética foi mais afetada do que a transpiração.

A *EiUA* não está diretamente correlacionada com a produtividade em plantios de eucaliptos (WHITE *et al.*, 2016). Sendo, no entanto, resultado de mecanismos que visam priorizar a sobrevivência em condições estressantes (SILVA *et al.*, 2015). Uma vez que a *EiUA* é estabelecida pela relação de *A/E*, espera-se que em condições ideais de hidratação, radiação e temperatura amenas, os estômatos estejam abertos facilitando a entrada de CO₂ e saída H₂O. O aumento da perda de água irá reduzir a *EiUA*, de maneira a priorizar aumento da biomassa, visto que não há necessidade de recorrer a mecanismos que evitem desidratação. Por outro lado, em condições nas quais a quantidade de água é um fator limitante, os genótipos que apresentarem maior *EiUA* conseguirão maior acúmulo de biomassa.

O rendimento quântico da fluorescência da clorofila é reduzido nas plantas dos tratamento T2 e T3, porém, mantido nas plantas dos tratamentos T4 e T5, de maneira geral, mostram que o ciclo de estresse condicionam as plantas a tolerarem maiores períodos de seca. No entanto, apesar de ter o rendimento quântico reduzido, nesse estágio do estresse, essas plantas ainda mativeram o aparelho fotossintético em bom estado. Considera-se dano no aparelho fotossintético quando a razão F_v/F_m atinge valores abaixo de 0,75 (BOLHAR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989).

4.3 Mortalidade das plantas

A maior sobrevivência constatada nas plantas dos grupos T4, pode ser em função do maior intervalo entre um estresse e outro, atrelado com uma quantidade de ciclos de estresses suficientes para promover a aclimação das plantas. Estudos sugerem que além dos mecanismos de tolerância induzidos pelo déficit hídrico, a disponibilidade de reservas de carbonos no início de cada episódio de estresse é fundamental para a determinação da tolerância em recorrência do mesmo tipo de estresse ou qualquer estresse de outra natureza. Assim, repetidos estresse em intervalos curtos de tempo, seria insuficiente para preencher todas as reservas de carbono, não permitindo que tolere de forma adequada o próximo estresse, deixando-a mais debilitada a cada ciclo (NIINEMETS *et al.*, 2010). Dessa forma, acreditava-se que as plantas que passaram por dois estresses semanais sobreviveriam por mais tempo do que as que sofreram três estresses por semana, visto que tiveram mais tempo para reporem suas reservas de carbono. No entanto, não foi observada nenhuma diferença entre os dois tratamentos que comprovasse isso.

4.4 Análises bioquímicas

A exposição de plantas ao déficit hídrico geralmente resulta na geração de EROs como os radicais superóxidos (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, causar danos oxidativos e alteração das funções normais das células (FOYER; FLETCHER, 2001).

O aumento da produção de EROs, nesse caso, particularmente de H_2O_2 , provocou aumento da peroxidação lipídica, conforme indicado pelo teor de MDA significativamente mais elevados em plantas dos tratamentos T2 e T3 (FIGURA 15).

Nas plantas do grupo T4 e T5, observa-se menores concentrações tanto de H_2O_2 , como de MDA. Essas menores concentrações para esses compostos podem estar relacionadas tanto com uma menor geração de EROs nessas plantas, como também a maior eficiência do complexo antioxidante em combater os radicais livres.

As EROs não apenas causam a peroxidação lipídica da membrana, mas também podem levar a danos em proteínas e inativam enzimas envolvidas em diferentes processos fisiológicos (SAIRAM *et al.*, 2002). Para evitar esses danos, as plantas possuem um sistema defensivo catalisado por enzimas especializadas na eliminação dessas EROs, e quem em condições de estresses estão bem ativos (TARIQ *et al.*, 2018). A atividade de algumas dessas enzimas (SOD, CAT e MDHAR) que compõe esse complexo enzimático foram avaliadas, a fim de verificar as alterações provocadas pelos diferentes ciclos de estresse.

Os dados observados para a SOD correlacionam com os resultados obtidos para quantificação de H_2O_2 e MDA, uma vez que valores de H_2O_2 e MDA mais altos estão justamente nos grupos de plantas com maior atividade da SOD.

Sendo a SOD uma das enzimas do complexo antioxidantes com ação intracelular presente em todos os organismos aeróbios, e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo originado por espécies reativas de oxigênio (EROs), ela age removendo o O_2^- catalisando sua dismutação, sendo um O_2^- reduzido a H_2O_2 e outro oxidado a O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, a SOD é a enzima dentro do grupo dos antioxidantes que responde mais rapidamente ao estresse oxidativo, portanto, importante na tolerância ao estresse de plantas por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos provocados pelo acúmulo de EROs (SHVALEVA *et al.*, 2006).

Aumento na atividade da CAT também foi observado por Menezes-Silva *et al.* (2017) quando avaliaram o efeito de eventos repetidos de déficit hídrico em *Coffea canephora*. Além do aumento na atividade da CAT foi observado pelos autores maiores concentrações de

glicina indicando aumento da atividade fotorrespiratória e geração de H_2O_2 , sugerindo que maiores atividade da CAT foi uma das estratégias utilizadas pelas plantas para mitigar os efeitos prejudiciais do H_2O_2 .

Importante observar também, que o número de ciclos de déficit hídrico influenciou, reduzindo cerca de 34%, quando comparados ao T2 e ao T4. Aumento na síntese e atividade da MDHAR é uma resposta primária ao déficit hídrico, mitigando o estresse oxidativo, aumentando a regeneração do ascorbato, como também da glutatona e de suas formas oxidadas, a fim de manter o balanço celular redox (NOCTOR *et al.*, 2002). Em conformidade com o que foi afirmado, maior atividade da MDHAR foi observada em mudas de *Oryza sativa* L., quando submetidas à déficit hídrico progressivo, mostrando aumento de atividade proporcional ao aumento do déficit hídrico (PYNGROPE; BHOOMIKA; DUBEY, 2013).

Efeitos dos estresses recorrentes são observados no presente trabalho, haja vista que em muitas das variáveis analisadas os ciclos de estresse contribuíram para respostas positivas.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que as plantas, quando expostas a múltiplos ciclos de déficit hídrico, ajustam o seu metabolismo, potencializando os mecanismos de defesa para responderem mais rápido e vigorosamente em uma futura situação de seca.

De maneira prática, os dados indicam que o índice de pegamento de mudas de eucalipto pode ser melhorado quando o manejo de ciclo de déficit hídrico for aplicado ainda em condições de viveiro. Dessa forma, diminuirá a necessidade de replantio e também a quantidade de água utilizada, reduzindo o custo de implantação da floresta.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 63, p. 3523-3544, 2012.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 116, p. 651-658, 1998.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R. *et al.* Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. **British Ecological Society**, [S.l.], v. 3, p. 497-514, 1989.
- BRONDANI, G. E. *et al.* Dynamics of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, [S.l.], v. 34, p. 169-178, 2012.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, [S.l.], v. 52, p. 302-310, 1978.
- CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v. 83, p. 463-468, 1991.
- FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 7, 2016.
- FOYER, C. H.; FLETCHER, J. M. Plant antioxidants: colour me healthy. **Biologist**, [S.l.], v. 48, p. 115-120, 2001.
- FLYNN, B. *Eucalyptus*: having an impact on the global solid wood industry. Wood Resources International. 2010.
- FU, Z. Q.; DUNG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, [S.l.], v. 64, p. 839-863, 2013.
- GALLE, A. *et al.* 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**. [S.l.], v. 62, p. 5207-5216, 2011.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 59, p. 309-314, 1977.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, p. 909-930, 2010.
- HATZ, S.; LAMBERT, J.D.C.; OGILBY, P.R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [S.l.], v. 10, p. 1106-1116, 2007.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 84, p. 450-455, 1987.

HOSSAIN, M. A.; NAKANO, Y.; ASADA, K. Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. **Plant and Cell Physiology**, [S.l.], v. 25, p. 385-395. 1984.

MARCOS, F. C. C. *et al.* Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 223, p. 9-18, 2018.

MENEZES-SILVA, P. E. *et al.* Photosynthetic and metabolic acclimation to repeated drought events play key roles in drought tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 15, p. 4309-4322, 2017.

NIINEMETS, U. Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 260, p. 1623-1639, 2010.

NOCTOR, G. *et al.* Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of experimental botany**, [S.l.], v. 53, p. 1283-1304, 2002.

SAIRAM, R. K.; RAO, K. V.; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, [S.l.], v. 163, p. 1037-1046, 2002.

SÁNCHEZ-DÍAS, M.; TAPIA, C.; ANTOLÍN, M.C. Drought-induced oxidative stress in Canary laurel forest tree species growing under controlled conditions. **Tree Physiology**, [S.l.], v. 27, p. 1415-1422, 2007.

SHVALEVA, A. L. *et al.* Metabolic responses to water deficit in two Eucalyptus globulus clones with contrasting drought sensitivity. **Tree physiology**, [S.l.], v. 26, p. 239-248, 2006.

SILVA, P. H. M. *et al.* Aplicação foliar de bora em eucalipto sob estresse hídrico. **Scientia Forestalis**, [S.l.], v. 43, p. 395-405, 2015.

STRASSER, R. J. *et al.* The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: YUNUS, M. *et al.* (Ed.). **Probing photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation**. London: Taylor & Francis, 2000. p. 443-480.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TARIQ, A. *et al.* Impact of phosphorus application on drought resistant responses of *Eucalyptus grandis* seedlings. **Physiologia Plantarum**, 09 nov. 2018.

UZILDAY, B. *et al.* Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C₄) and *Cleome spinosa* (C₃) under drought stress. **Plant Science**, [S.l.], v. 182, p. 59-70, 2012.

VIRLOUVET, L.; FROMM, M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. **New Phytologist**, [S.l.], v. 205, p. 596-507, 2015.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, [S.l.], v. 151, p. 59-66, 2000.

WALTER, J. *et al.* Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 71, p. 34-40, 2011.

WHITE, D. A. *et al.* Wood production per evapotranspiration was increased by irrigation in plantations of *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. **New Forests**, [S.l.], v. 47, p. 303-3017, 2016.