



**PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES**

**EFEITOS DA RUSTIFICAÇÃO EM MUDAS DE  
EUCALIPTO NA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT  
HÍDRICO**

**LAVRAS-MG  
2017**

**PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES**

**EFEITOS DA RUSTIFICAÇÃO EM MUDAS DE EUCALIPTO NA  
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

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

Prof. Dr. Anderson Cleiton José  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2017**

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

Alves, Patrick Callegari Magnani Santos.

Efeitos da rustificação em mudas de eucalipto na tolerância ao  
déficit hídrico / Patrick Callegari Magnani Santos Alves. - 2017.  
122 p.

Orientador(a): Anderson Cleiton José.

.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. Eucalipto urograndis. 2. Rustificação. 3. Déficit hídrico. I.  
José, Anderson Cleiton. . II. Título.

**PATRICK CALLEGARI MAGNANI SANTOS ALVES**

**EFEITOS DA RUSTIFICAÇÃO EM MUDAS DE EUCALIPTO NA  
TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO**

**HARDENING EFFECTS ON EUCALYPT SEEDLINGS IN TOLERANCE  
TO THE WATER DEFICIT**

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

APROVADA em 17 de julho de 2017.  
Dr. Gilvano Ebling Brondani UFLA  
Dr. Lucas Amaral de Melo UFLA  
Dra. Fernanda Carlota Nery UFSJ  
Dr. Carlos Vinicio Vieira, UFMT

Prof. Dr. Anderson Cleiton José  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2017**

A todos aqueles que passaram em minha vida e me sensibilizaram com gestos, palavras ou olhares. Em especial, aos meus pais Pio Alves da Silva Filho e Vilma Magnani Santos Alves pelo exemplo de companheirismo, carisma, simplicidade e principalmente de respeito e amor à vida, o qual eu me espelho e procuro transmitir todos os dias que vivo.

Ao meu melhor amigo e irmão Erick Serrat.

As minhas avós Maria Serrat “Cotinha” e Maria de Lourdes “Lilia” (*in memorian*) a minha madrinha Lecy Alves (*in memorian*) pelo vínculo sublime na minha vida. O exemplo que deixaram me ajuda a seguir, mesmo sentindo tanto a ausência física de vocês.

Aos mestres de luz e amigos do Despertar da Divina Consciência (DEDICO)  
A minha noiva Marcelle Carvalho por ter me auxiliado em momentos difíceis e por ter me mostrado um caminho de luz, união e amor

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela presença constante em minha vida.

Ao professor Dr. Anderson C. José pela orientação, paciência, amizade, dedicação e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e também do meu crescimento profissional. Agradeço de todo o coração!

A empresa Esteio pelo fornecimento das mudas utilizadas no projeto.

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva, pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Biotecnologia vegetal da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos e harmoniosa convivência.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia Vegetal, bem como ao Departamento de Ciências Florestais (DCF), pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Aos amigos certos das horas incertas Erick Serrat,

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

Aos amigos do Laboratório de Sementes Florestais pela forte relação de amizade e companheirismo e por me aceitarem como membro do grupo e pelos divertidos momentos que passamos.

A Alexandra por ajudar a manter meu lar limpo e pelas excelentes refeições que tive o privilégio de saborear .

Aos amigos do departamento Plant Science na Penn State University que me acolheram e me ajudaram a desenvolver práticas que colaboraram com o desenvolvimento do projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

**" Tudo passa, o Amor permanece. "**  
**(Mestre Micaell)**

## RESUMO

A prática de rustificação induz modificações em diferentes tecidos e para o enfrentamento de condições de déficit hídrico. Nesse processo a planta modifica sua resposta moleculares propiciando proteção as alterações ambientais. Objetivou-se com esse trabalho analisar respostas fisiológicas e moleculares do eucalipto urograndis na rustificação e comparar a resposta das mudas ao estresse hídrico. A rustificação foi realizada no período de 30 dias e parâmetros fisiológicos e moleculares foram analisados bem como no experimento de estresse hídrico que durou 14 dias. Durante a rustificação, o potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) diminuiu com média entre os potenciais mínimo e máximo dos tratamentos de -0,23 MPa no primeiro dia para -0,48 MPa no último. Mudas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre os tratamentos para clorofila total com as não rustificadas obtendo quantidade superiores. a Fotossíntese ( $A$ ), carbono intercelular ( $C_i$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) variou significativamente entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Nos aspectos moleculares, as enzimas SOD, CAT e MDHAR aumentaram a atividade indicando aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nas análises anatômicas do parênquima radial externo ao xilema verificou-se acúmulo de células coradas com lugol nas mudas em rustificação. Mudas rustificadas e não rustificadas quando submetidas ao déficit hídrico apresentaram resposta diferenciada quanto a fotossíntese ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e carbono intercelular ( $C_i$ ). Mudas não rustificadas apresentaram maior porcentagem em murcha ao longo dos 14 dias, atingindo 100% sendo desses 56% em ponto de murcha aparente e 44% em murcha permanente, enquanto que as mudas rustificadas apresentaram 62% em murcha, dos quais 42% em murcha aparente e 20% em murcha permanente e 38% sem sintoma de murcha. Conclui-se que a rustificação altera as respostas fisiológicas e moleculares das mudas e essas modificações estão associadas com a resposta positiva das mudas aclimatadas a condições de estresse impostas pelo déficit hídrico.

**Palavras-chave:** Rustificação, urograndis, Silvicultura

## Abstract

Hardening is important due it induces modifications in different tissues and consequently to the confrontation of water deficit. During this process plant modifies responses at molecular and physiological levels. The objective of this work was to analyze the physiological and molecular responses of eucalipt urograndis submitted to hardening and compare the responses of hardened and non-hardened seedlings subjected to water stress. The hardening was carried out in the period of 31 days. Physiological and molecular parameters were analyzed, during hardening and water stress experiment which as carried out after seedling hardening and lasted 14 days. During hardening it was observed that leaf water potential ( $\Psi_w$ ) decreased with mean between the minimum and maximum potentials ranging from -0.23 MPa on the first day to -0.48 MPa in the latter. It was observed significant differences ( $p < 0.001$ ) among the treatments for total chlorophyll where non-hardened seedlings showed higher chlorophyll content. Photosynthesis ( $F_t$ ), internal carbon ( $C_i$ ) and stomatal conductance ( $G_s$ ) showed significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ). Increase in the activity of the enzymes SOD, CAT e MDHAR was observed indicating an increase in the leaves of reactive oxigen species (ROS). In the anatomical analyzes of the radial parenchyma external to the xylem, it is possible to verify an increase in the number of cells stained with lugol in seedlings during hardening. Hardened seedlings and non-hardened when submitted to water deficit showed a different response to photosynthesis and stomatal conductance. Non-hardened seedlings presented a higher percentage of seedlings showing wilting symptoms at 14 days (100%) of which 69% presented apparent wilting and 31% of permanent wilting. Hardened seedlings presented 20% without wilting, 52% of apparent wilting and 28% of permanent wilting. It is concluded that hardening changes the physiological and molecular responses of the seedlings and these modifications are associated with the positive response of the acclimated seedlings to stress conditions imposed by the water deficit.

**Keywords:** Hardening, urograndis, Silviculture

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema resumido de algumas interações ocorridas em resposta ao estresse hídrico.....	29
Figura 2 – Dados climatológicos do mês de julho de 2016.....	55
Figura 3 – Curvas de potencial hídrico foliar.....	61
Figura 4 – Eficiência instantânea do uso da água.....	64
Figura 5 – Regressão para quantidade de clorofila total.....	65
Figura 6 – Condutância estomática.....	67
Figura 7 – Taxa de fotossíntese líquida.....	68
Figura 8 – Relação entre $g_s$ , $C_i$ e $\Psi_w$ .....	70
Figura 9 – Secção caulinar de mudas não rustificadas.....	72
Figura 10 – Secção caulinar de mudas não rustificadas.....	73
Figura 11 – Atividade específica da SOD.....	76
Figura 12 – Atividade específica da CAT.....	77
Figura 13 – Atividade específica da MDHAR.....	78
Figura 14 – Dados climatológicos dos dias 23/08 a 03/09/2016 .....	91
Figura 15 – Murcha aparente e permanente.....	96
Figura 16 – Evolução dos sintomas de murcha.....	98
Figura 17 – Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ).....	99
Figura 18 – Número de folhas em mudas do urograndis.....	100
Figura 19 – Taxa de Fotossíntese ( $A$ ).....	102
Figura 20 – Taxa de transpiração ( $E$ ).....	105
Figura 21 – Taxa de Condutância estomática ( $g_s$ ).....	106
Figura 22 – Taxa de Concentração de carbono intracelular foliar ( $C_i$ )....	107
Figura 23 – Atividade específica da enzima SOD.....	109

Figura 24 – Atividade específica da enzima catalase.....	110
Figura 25 – Atividade específica da enzima MDHAR.....	112

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Trocas gasosas em mudas em rustificação e não rustificadas.....	64
Tabela 2 – Resultados analíticos do solo de textura média.....	89
Tabela 3 – Média de clorofila total.....	119
Tabela 4 – Atividade da CAT, SOD e MADHAR .....	119
Tabela 5 – Média das variáveis <i>A</i> , <i>g<sub>s</sub></i> e <i>E</i> .....	120
Tabela 6 – Atividade da CAT, SOD e MADHAR ao longo do déficit hídrico.....	120
Tabela 7 – Relação simplificada da ação de genes e moléculas em resposta ao estresse hídrico.....	121

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	A influência do potássio (K <sup>+</sup> ) no controle osmótico.....	19
2.2	Características do híbrido e Mudanças climáticas.....	20
2.3	Tolerância ao déficit hídrico.....	22
2.4	Efeitos da rustificação na tolerância ao déficit hídrico de mudas.....	24
2.5	Ativação de mecanismos de resistência ao déficit hídrico.....	26
2.5.1	Alterações morfofisiológicas de plantas sob estresse hídrico.....	30
2.5.2	Embolismo e ajuste hidráulico.....	32
2.5.3	Alterações moleculares de plantas sob estresse hídrico.....	34
2.6	Alterações moleculares de plantas em rustificação.....	36
2.7	Análise anatômica para estudo de déficit hídrico de plantas.....	38
2.8	Tolerância dos materiais genéticos de eucalipto ao déficit hídrico....	39
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	<b>CAPÍTULO 2</b> Respostas fisiológicas, moleculares e anatômicas no híbrido <i>urograndis</i> durante a rustificação.....	51
1	INTRODUÇÃO.....	53
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1	Local e clima.....	54
2.2	Material biológico e rustificação.....	55
2.3	Análises fisiológicas.....	56
2.4	Análises anatômicas.....	58
2.5	Enzimas antioxidantes.....	58
2.5.1	Dismutase do superóxido (SOD).....	58
2.5.2	Catalase (CAT).....	59

2.5.3	Monodehidroascorbato (MDHAR).....	60
2.5.4	Delineamento experimental e análise estatística.....	60
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4	CONCLUSÃO.....	79
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
	<b>CAPÍTULO 3</b> Respostas fisiológicas e moleculares de mudas rustificadas e não rustificadas do híbrido urograndis ( <i>Eucalyptus</i> <i>urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> ) submetidas ao déficit hídrico.....	85
1	INTRODUÇÃO.....	87
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
2.1	Material vegetal, localização e solo.....	88
2.2	Estresse hídrico.....	89
2.3	Análise de temperatura e umidade.....	90
2.4	Análises fisiológicas.....	91
2.5	Determinação do $\Psi_w$ .....	92
2.6	Atividade de enzimas do sistema antioxidante.....	92
2.6.1	Dismutase do superóxido (SOD).....	93
2.6.2	Catalase (CAT).....	94
2.6.3	Monodehidroascorbato (MDHAR).....	94
2.7	Análise de murcha e formação de folhas novas.....	94
2.8	Delineamento experimental e condução do experimento.....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
4	CONCLUSÃO.....	113
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
	ANEXO A – Tabelas de análises fisiológicas e moleculares.....	119
	ANEXO B – Moléculas de resposta ao estresse hídrico.....	135

## **CAPÍTULO 1:**

### **RESUMO**

A manutenção do equilíbrio osmótico e das funções fisiológicas normais das plantas são processos que dependem diretamente do ambiente no qual ela se encontra. Por constituir-se num dos principais agentes causadores da mortalidade em plantio florestal o estresse causado pela seca, que pode ser ocasionado por veranico é uma das principais causas da mortalidade de mudas após o plantio. Para o melhor desenvolvimento das mudas pós plantio e também para o enfrentamento de déficit hídrico a produção de mudas florestais conta com a prática de rustificação. Essa técnica usa do manejo de recursos ambientais como aumento da radiação solar e redução gradativa de irrigação bem como o uso da fertilização por KCl. A rustificação baseia-se na capacidade das plantas de acionar mecanismos de resposta a estímulos ambientais que podem estar inativos ou latentes e respondem quando as plantas são expostas aos agentes de indução. Pretendeu-se nesse trabalho abordar algumas práticas de produção de mudas de espécies florestais bem como revisar mecanismos fisiológicos e moleculares que podem ser acionados com alterações ambientais, em específico o estresse hídrico correlacionando esse com a prática de rustificação. Espera-se que a pesquisa possa prover subsídios ao fomento de novos estudos.

Palavras-chave: Rustificação, urograndis, Déficit hídrico

## **ABSTRACT**

Maintenance the osmotic equilibrium and normal physiological functions of plants are processes that depend directly on the environment in which they are found. Because it is one of the main agents that causes mortality in forest plantations, the stress caused by drought, which can be caused by water shortage after planting, is one of the main causes of seedling mortality. For the better development an increased response of seedlings after planting to water deficit, nursery uses the practice of hardening. This technique uses the management of environmental resources such as the increase in solar radiation, gradual reduction of irrigation and KCl fertilization. This practice uses the ability of plants to activate protection mechanisms in response to environmental stimuli which may be inactive or latent and can be triggered when plants are exposed to induction agents. The aim of this work was to discuss some practices of forest seedling production as well as to review physiological and molecular mechanisms induced by environmental changes, in particular the water stress and its correlation with the practice of hardening. It is hoped that the research may provide subsidies for the promotion of new studies.

Key words: Hardening, urograndis, Water deficit

## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* é um dos mais plantados no mundo devido a qualidade e a versatilidade da aplicação da sua madeira podendo ser usada para diversos fins como produção de papel e celulose, carvão e produtos de madeira sólida. Esse gênero é caracterizado pela alta taxa de crescimento, ocupando uma área de plantio muito extensa, estimada em aproximadamente 5,6 milhões de hectares no Brasil como destaque em área plantada, Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%) (IBÁ, 2016). Os benefícios gerados pelos plantios, no Brasil, não estão reservados apenas ao âmbito econômico, estima-se que a área plantada é responsável pelo sequestro de 1,7 bilhões de toneladas de dióxido de carbono (IBÁ, 2016).

Assim como em todas as espécies arbóreas a disponibilidade de água é impactante para o desenvolvimento e para a produtividade do eucalipto. Dessa forma, o conhecimento dos mecanismos de combate ao estresse hídrico através das vias metabólicas faz-se necessário. Condições ambientais adversas como seca podem ser responsáveis por uma série de alterações de caráter fisiológico, morfológico e/ou anatômico. É sabido que em estresse hídrico moderado as plantas possuem a tendência em diminuir o potencial hídrico foliar, obter ajuste osmótico além de aumentar as ramificações radiculares tanto em número quanto em comprimento. Essas modificações, podem resultar na obtenção de maior eficiência na utilização do recurso hídrico pela planta (AKHTAR et al. 2013; BHARGAVA et. al, 2013; VALDÉS et al., 2013).

Com a finalidade de induzir a manifestação de efeitos resultantes das alterações fisiológicas que podem ser benéficas para as mudas em caso de déficit hídrico após o plantio, viveiros de mudas florestais realizam um processo de aclimação específico, chamado de rustificação. Esse processo consiste na

alteração do regime de rega e fertilização, especificamente de ajustes em ajustes de nitrogênio e potássio. Essas alterações otimizam o processo de abertura e fechamento estomático, devido ao fato de que o íon  $K^+$  pode alterar a forma física da molécula de algumas enzimas, expondo seu sitio ativo, além de neutralizar vários ânions e outros compostos, ajudando a manter a estabilização do pH intracelular e o ajuste osmótico (BATTIE-LACLAU et al., 2013, SILVEIRA e MALAVOLTA, 2000).

## **1 INTRODUÇÃO**

A silvicultura apresenta técnicas que buscam a elevada sobrevivência de mudas transplantadas. Tendo em vista que a mortalidade logo após o plantio é frequentemente associada à hidratação inadequada das mudas. As mudas comumente são condicionadas para enfrentar a seca que eventualmente, podem vir a sofrer após o transplante. Dessa forma, as mudas são expostas a condições de seca controlada no viveiro. As práticas aplicadas nos viveiros com essa finalidade consistem na redução gradativa do regime de irrigação e modificações na relação N/K nas adubações de cobertura. Esse condicionamento é chamado de rustificação e essa prática induz modificações fisiológicas, anatômicas e moleculares garantindo às mudas características desejadas para prolongar a sua sobrevivência ao déficit hídrico quando em comparação a mudas que não passaram pela rustificação.

As mudas sob rustificação enfrentam um estresse controlado tendendo a ter um desvio significativo das condições ótimas, podendo induzir mudanças e respostas metabólicas, reversíveis ou permanentes, em níveis fisiológicos e moleculares. As plantas, ao longo de sua vida, estão sujeitas a condições múltiplas de estresses que podem limitar seu desenvolvimento e diminuir as chances de

sobrevivência, uma dessas condições é o estresse hídrico que pode ocorrer por conta da falta ou do excesso de água. O gênero *Eucalyptus* apresenta diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico, o que está diretamente associado às características genéticas de cada espécie. Em geral, as espécies de eucalipto quando estão em condições de estresse hídrico possuem a tendência de reduzir a biomassa da planta, aumentar a relação raiz/parte aérea, aumentar a resistência estomática resultando na redução da transpiração e fotossíntese líquida (SHARP et al., 2004; SUSILUOTO e BERNINGER, 2007). O comportamento de plantas submetidas à rustificação difere de espécie para espécie conferindo geralmente alterações fisiológicas como diminuição nas taxas de transpiração, fotossíntese, potencial hídrico foliar além de mudanças morfológicas como aumento da lignificação do caule e da relação raiz/parte aérea (TODOROVA et al., 2016; DRANSKI et al., 2013; HUANG et al., 2013).

Tendo em vista a importância dessa técnica objetivou-se com esse trabalho analisar modificações fisiológicas e moleculares durante a rustificação e comparar mudas rustificadas e não rustificadas submetidas ao estresse hídrico. Além disso, pretendeu-se avaliar os efeitos do processo de rustificação nas alterações de deposição de amido no parênquima do xilema em clones de eucalipto, além de revisar as estratégias durante a fase do estresse hídrico, correlacionando a condição de ausência de estresse e elucidando mecanismos moleculares de reparo a danos causados em decorrência do estresse hídrico ao longo do tempo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A influência do potássio ( $K^+$ ) no controle osmótico

A fertilização com potássio ( $K^+$ ) pode ter como resultado alterações fisiológicas eficientes na tolerância ao estresse hídrico e por esse motivo, essa prática pode ser considerada de grande importância na produção de mudas florestais. O ajuste osmótico pode ser influenciado conforme aumenta a concentração de  $K^+$  foliar (CAKMAK, 2005). Essa alteração também possui influência direta no controle da abertura e fechamento estomático e na proteção contra danos causado pelo estresse oxidativo (WANG et al., 2013).

Quando comparado com outros nutrientes o  $K^+$  ainda possui influência direta no crescimento das mudas. BATTIE-LACLAU, et al., 2014 observaram ganho em biomassa de 52% maior, quando comparado com mudas de *Eucalyptus grandis* supridas por sódio. Outro importante fator observado pelos autores foi o aumento do turgor foliar durante períodos de seca pelo incremento do ajuste osmótico. O aumento da concentração desse íon contribui para a diminuição do potencial osmótico nas folhas e conseqüentemente para o aumento do turgor (BATTIE-LACLAU et al., 2013).

No controle da abertura e fechamento estomático alguns fatores ocorrem em conjunto com o aumento da concentração do  $K^+$  proporcionando maior eficiência nesses processos. Por exemplo há a interação desse íon com canais iônicos tornando-o mais permeável a membranas celulares, permitindo maior eficiência na difusão entre as células. Em momentos de efluxo de  $K^+$ , a interação entre o malato e a quebra do amido, proveniente do mesófilo pode favorecer a diminuição do potencial osmótico e influenciar na abertura estomática (AZOULAY-SHEMER, et al., 2016; PRASCH et al., 2015).

Fatores hormonais também influenciam na saída de potássio das células estomáticas. É sabido que com o estímulo inicial ao estresse é transmitido para as células via sinalização química entre receptores celulares e síntese de ácido abscísico (ABA). O fitohormônio media o aumento da concentração de cálcio no citosol o qual estimula o efluxo de potássio, aumentando o potencial hídrico (Sridha e Wu 2006). Outra influencia hormonal pode ser observada na diferença de concentração de auxina. Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013, observaram que baixas concentrações de auxina induziram o influxo de potássio nas células guarda enquanto o aumento da concentração desse fitohormônio proporcionou o efluxo.

## **2.2 Características do híbrido urograndis e mudanças climáticas**

O Estado do Espírito Santo foi o pioneiro no plantio do híbrido urograndis (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) que ocorreu em meados de 1979. Porém, o híbrido veio a se destacar economicamente somente na década de 90 impulsionando o ritmo de crescimento florestal e aumentando a qualidade das florestas plantadas (LOPES, 2008). A melhoria desse híbrido deve-se ao excelente comportamento em viveiro, destacando-se o enraizamento. E no campo apresenta características de resistência à patógenos como o fungo *Puccinia psiidi*, causador da ferrugem (TEIXEIRA et al., 2009; FREEMAN et al., 2008; CARVALHO et al., 1998). O híbrido possui ainda a vantagem de ter a madeira com maior densidade do que as espécies que o originou, sendo um dos clones mais plantados no país. Além disso, o mesmo possui as características comerciais desejadas das duas espécies que são o bom crescimento da planta, característico do *Eucalyptus grandis* e aumento na densidade da madeira proporcionado pelo *Eucalyptus urophylla* (MURO, 2000).

Tendo em vista o aumento de áreas plantadas onde as condições climáticas não são favoráveis para o ótimo desenvolvimento da cultura (IBÁ, 2016) além das alterações ambientais, faz-se cada vez mais necessário o estudo das respostas e mecanismos que as plantas possuem para suportar as alterações ambientais. A elevação na temperatura aumenta a capacidade do ar em reter vapor d'água e, conseqüentemente, há maior demanda hídrica. Em resposta a essas alterações, os ecossistemas de vegetais poderão aumentar a sua biodiversidade ou sofrer influências negativas, pois acredita-se que com a elevação das temperaturas milhares de espécies estarão ameaçadas de extinção até o ano de 2050 (SALATI et al., 2004; THOMAS et al., 2004). A rustificação por induzir modificações que garantem certo grau de tolerância ao estresse hídrico é uma ferramenta importante para o enfrentamento de veranicos que podem causar estresse hídrico moderado a severo após o plantio. Sendo assim, faz se necessário o estudo das alterações que essa prática induz, tanto durante a rustificação, quanto no decorrer do estresse hídrico.

### **2.3 Tolerância ao déficit hídrico**

As plantas estão expostas a vários fatores de estresse ambiental comumente referidos como "estresses abióticos". Este termo inclui, por exemplo, seca, salinidade, temperaturas extremas e hipóxia. O estresse hídrico é um dos que apresenta maior risco à vida das plantas, afetando processos como fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos, absorção de íons, os quais são cruciais para a sobrevivência do indivíduo (ANGELOCCI, 2002).

As plantas adquirem tolerância ao estresse, alterando o metabolismo interno e a expressão gênica. Em alguns casos, as plantas podem adquirir capacidade de responder melhor a situações ambientais críticas (PATHAN et al.,

2004). O ajuste à limitação de água pode ocorrer por rustificação, o que as tornam mais resistentes e produtivas em condições adversas. Alterações na biomassa da planta, aumento da relação raiz/parte aérea, aumento do controle estomático, resultando em alterações na taxa de transpiração e fotossíntese líquida podem ser algumas das respostas morfo fisiológicas mais comumente observadas ao estresse hídrico controlado em plantas (SHARP et al., 2004; SUSILUOTO e BERNINGER, 2007).

Um alto grau de tolerância ao estresse hídrico também pode ser conferido por características anatômicas constitutivas que são estáveis em plantas superiores e, portanto, podem atuar como indicadores (KULKARNI et al., 2008; RHIZOPOULOU e PSARAS, 2003). Para uma compreensão abrangente dos mecanismos de tolerância a estresse hídrico em plantas, aspectos da fisiologia e bioquímica celular devem ser investigados em combinação com as características morfoanatômicas, a fim de evidenciar as interações que levam a resistência à seca.

Em condições de déficit hídrico, a raiz reduz a absorção de água do solo (MORONI et al., 2003) em seguida pode ocorrer o fechamento dos estômatos pela regulamentação do ácido abscísico (ABA). Como resultado evidencia-se a diminuição da assimilação de CO<sub>2</sub> (PEUKE et al., 2002.; PINHEIRO et al., 2010). Além disso, com a presença de menor quantidade de água, o rendimento quântico do PSII pode ser reduzido (YADOLLAHI et al., 2011; CHA-HUM et al., 2010). Vários osmoprotetores como carboidratos, prolina, glicina betaína, e quercitol, são biosintetizados e acumulados durante o déficit hídrico ajudando na regulação da homeostase celular e no provável aumento da tolerância ao déficit hídrico (WARREN et al., 2002).

## 2.4 Efeitos da rustificação na tolerância ao déficit hídrico de mudas

A prática da rustificação é caracterizada como sendo um processo no qual há indução de resistência nas plantas ao estresse, sendo então considerada como uma adaptação que pode ser induzida ou aprimorada durante o desenvolvimento das mesmas (XOCONOSTLE-CÁZARES et al., 2010). As plantas jovens possuem metabolismo acelerado sendo mais aptas ao desenvolvimento de tecidos e mecanismos que conferem resistência à seca, sendo assim, a fase de plântula é ideal para serem condicionadas por meio da rustificação (XU, 1989).

A produção de mudas de boa qualidade está diretamente relacionada com a fertilização e o regime de irrigação. Na fase final da produção de mudas, o manejo desses recursos deve ser efetuado no sentido causar um estresse controlado, e dessa forma, condicionar a planta às condições de plantio. A finalidade da rustificação é reduzir a mortalidade das mudas após o plantio, tendo-se em vista que nem sempre é possível manter o nível de hidratação adequado (HUANG et al., 2013; THOMAS, 2009; COOPMAN et al., 2008).

A rustificação ou “endurecimento” geralmente é efetuado por aproximadamente 15 dias, antes do plantio. Na rustificação, a adubação com nitrogênio é suspensa e inicia-se um regime de fertilização rica em potássio. Aliado a isso, a irrigação é diminuída e o espaço entre as mudas, em pleno sol, é aumentado. Com isso a planta passa a responder a maior incidência de raios solares bem como ao aumento da camada limítrofe (camada de ar que influencia diretamente nas trocas gasosas entre a folha e a atmosfera), aumentando a cutícula na folha e conseqüentemente se adaptando as condições de diminuição da irrigação, gradativamente impostas. Sendo assim, essas modificações garantem um aumento da sobrevivência das mudas e conseqüentemente, a capacidade de

estabelecimento das mudas no campo sob condições adversas. (HUANG et al., 2013; ANGELOCCI, 2002).

A maior tolerância ao estresse está associada a alterações fisiológicas e morfoanatômicas induzidas em mudas que passaram pela rustificação. Durante esse processo a fertilização rica em potássio, otimiza o processo de abertura e fechamento estomático. Isso porque o íon  $K^+$  pode alterar a forma física da molécula de algumas enzimas, expondo seu sitio ativo, além de neutralizar vários ânions e outros compostos, ajudando a manter a estabilização do pH intracelular. Dessa maneira, a muda tem condição de aperfeiçoar o processo de retenção de água auxiliando na manutenção do turgor celular e na captação de  $CO_2$  (BATTIE-LACLAU et al., 2013; SILVEIRA e MALAVOLTA, 2000). A nível molecular esse íon atua na ativação enzimática, agindo na rota de pelo menos 60 diferentes enzimas envolvidas no crescimento das plantas (DIBB et al., 1998).

Com o aumento do controle estomático e da conseqüente retenção de água, a planta pode encontrar condições apropriadas ao desenvolvimento mesmo em ambientes menos favoráveis, assim como ocorre em condição de baixo recurso hídrico. A regulação estomática é feita de acordo com as alterações atmosféricas e hídricas. Sendo assim, a condutância estomática representa uma resposta da planta à fatores ambientais, afetando diretamente a taxa de fotossíntese e a transpiração. Algumas espécies arbóreas, no início do déficit hídrico possuem a tendência em reduzir a perda de água pelo fechamento dos estômatos, e, dessa forma, podem melhorar o balanço entre os fotoassimilados e a quantidade de água usada nas atividades fisiológicas. Entretanto, devido a esse comportamento, ocorre diminuição da taxa fotossintética, uma vez que o aporte de  $CO_2$  é diminuído (HUANG et al., 2013; ANGELOCCI, 2002).

Por outro lado, durante a rustificação a fertilização nitrogenada é suspensa. Esse nutriente é assimilado por meio de reações bioquímicas

envolvendo oxidações e reduções, formando ligações covalentes com o carbono na origem de compostos orgânicos, como por exemplo, aminoácidos, albuminas e ácidos nucleicos. Sabe-se que quando a planta apresenta um quadro de deficiência severa desse elemento, a formação de clorofila é prejudicada e a planta pode ter sérios prejuízos em suas funções vitais (CHRISTOPHE, et al., 2007). Esse processo pode ser utilizado com a finalidade de induzir o desenvolvimento do caule e conseqüentemente auxiliar no aporte de recursos hídricos. Essas respostas podem ocorrer pelo acúmulo de carboidratos que não serão utilizados na síntese de proteínas ou de outros compostos nitrogenados sendo visualmente identificada pela coloração arroxeada das folhas e no caule. (COOPMAN et al., 2008; CHRISTOPHE, et al., 2007).

Durante a rustificação são observadas modificações morfofisiológicas tanto na parte aérea quanto na raiz. Nota-se que pode haver engrossamento do caule e desenvolvimento do sistema radicular causado pelo regime de rustificação, essa indução no aumento em biomassa e atividade metabólica, evidencia aumento de atividade e conseqüentemente uma possível melhoria no aproveitamento dos recursos disponíveis no solo, mesmo que em baixas quantidades (HUANG et al., 2013; FERRARI, 2003). Mesmo com um baixo teor de água disponível nos tecidos, a diminuição do potencial osmótico pode garantir a manutenção da normalidade na respiração e no alongamento celular, com aumento na estabilidade da parede celular (VILLAR-SALVADOR et al., 2004).

O prolongamento do período de rustificação pode intensificar as características benéficas da rustificação em *Acacia cyanophylla* (ALBOUCHI et al., 1997), porém, em outras espécies, como o carvalho (*Quercus ilex*), esse tratamento pode ser inexpressivo (VILLAR-SALVADOR et al., 2004). Em se tratando de benefício ambiental, o processo de rustificação pode ser utilizado para tornar mais efetivo o reflorestamento em áreas degradadas suscetíveis a condições

de extremo déficit hídrico ou de seca prolongada, uma vez que as plantas rustificadas podem estar aptas a suportar esse fenômeno (HUANG et al., 2013). Em áreas comerciais a maior sobrevivência das mudas reduz os custos de implantação, aumentando seu aproveitamento além de garantir o crescimento uniforme da floresta.

## **2.5 Ativação de mecanismos de resistência ao déficit hídrico**

O início do estresse desencadeia alguns sensores primários, que por sua vez ativam as vias citoplasmáticas podendo acarretar em acúmulo iônico como por exemplo o de  $\text{Ca}^{2+}$  além de 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 mecanismo de fechamento estomático reduzindo a transpiração. Esse mecanismo é mediado pelo ácido abscísico (ABA) (WASILEWSKA et al., 2008). Esse fitohormônio é sintetizado nas raízes e translocado para órgãos da parte superior das plantas como caule e em especial, folhas (TAIZ E ZEIGER, 2009). O ABA é então conduzido, em sua forma aniônica para o interior das células do estômato que é induzido a fechar, diminuindo assim a condutância estomática.

Uma maior resistência estomática leva a menores perdas de água da superfície da folha, que é uma das primeiras respostas da planta em resposta ao estresse hídrico. Contudo, essa modificação diminui também a taxa fotossintética (BRODRIBB E MCADAM, 2013; FUJITA et al., 2004; IUCHI et al., 2001). As condições de déficit hídrico conduzem para uma diminuição na atividade da enzima ATPase da membrana plasmática devido a um menor fornecimento de ATP pela fotossíntese e respiração. Essa diminuição no aporte de ATP está também relacionado a danos no aparato do fotossistema II ocasionado pela

diminuição da quantidade de água na planta (GUIDI E 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 E 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; ZIDA et al. 2008).

Durante sua 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 espécies reativas, o organismo conta com a ação de enzimas antioxidantes como dismutase do superóxido (SOD), catalase, ascorbato peroxidase (APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR) entre outras e também antioxidantes não enzimáticos como ascorbato (AsA), carotenoides, antocianinas, tocoferóis, glutatona, entre outros. Esses elementos desempenham um papel importante no controle de EROs (SHARMA et al., 2014). Esses mecanismos estão conectados a uma comunicação genética complexa e eficiente que envolve a expressão de pelo menos 289 genes em *Arabidopsis thaliana* (GECHEV, et al., 2006).

O processo metabólico natural das plantas resulta em formação de substâncias que em excesso podem ser altamente prejudiciais as células e conseqüentemente a tecidos. Essas substâncias podem ser espécies reativas de oxigênio (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.

Entre 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 (fig. 1). Deve-se notar também que, juntamente com EROs, nitrogênio reativo e 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 ocorre nos cloroplastos, a produção de EROs pode ser intensificado quando há ocorrência de fatores que estimulam a energização dessas cadeias (DAT et al., 2000). Dessa maneira, há formação de  $\cdot\text{O}_2$  gerado principalmente a partir do fluxo de elétrons dos centros Fe-S do fotossistema I ou ferredoxina reduzida para  $\text{O}_2$  (reação de Mehler). Outra forma de supressão de  $\cdot\text{O}_2$  é pela interação dessa molécula com carotenoides e tocoferóis que impedem que sejam gerados estados mais avançados de excitação (Asada, 1999).

Nos peroxissomos também ocorrem produção de EROs durante a fotorrespiração e oxidação de ácidos graxos (DEL RIO et. al., 2001). Sob condições que prejudicam a fixação de  $\text{CO}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  sendo convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  pela enzima catalase (DINAKAR et al., 2010).

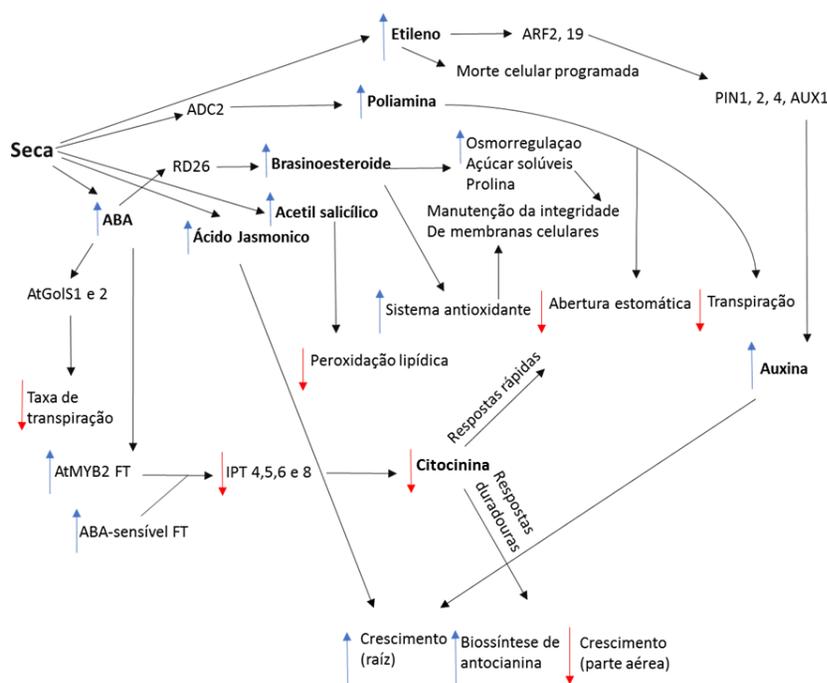


Figura 1: Esquema resumido de algumas interações ocorridas em resposta ao estresse hídrico elucidando interações em crosstalk entre fito hormônios em resposta ao estímulo causado pelo déficit hídrico. Fonte: Do autor (2017).

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 *Eucalyptus grandis* possui alta eficiência em eliminar EROs, esse fato é comprovado pela alta variedade de clusters para enzimas antioxidantes, possuindo uma das maiores famílias de genes codificantes para SOD. No total, 12 clusters já 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), 4 para MDHAR conforme consta no banco de dados do projeto genoma (FOREST) para essa espécie (TEIXEIRA et al., 2005).

### **2.5.1 Alterações morfofisiológicas de plantas sob estresse hídrico**

Podendo ser potencializado pelas mudanças climáticas, o déficit hídrico é um dos principais problemas abióticos que limitam o crescimento e a produção (DIFFENBAUGH e FIELD, 2013). Devido as mudanças climáticas algumas culturas podem ficar susceptíveis ao estresse acarretado pelo aumento da temperatura e ausência de água o que pode prejudicar o desenvolvimento da planta. (CATTIVELLI et al., 2008). Portanto, é necessário que haja cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas científicas visando a compreensão dos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico atrelado a caracterização dos mecanismos utilizados para essa finalidade.

Uma das primeiras estruturas a responder as alterações ambientais são os estômatos. O mecanismo que provoca a abertura estomática está ligado diretamente à absorção de água pelas células-guarda. Quando as folhas são expostas à luz e a outros fatores externos como ABA exógeno, pode ocorrer um aumento significativo na concentração de íons potássio nestas células (HUANG et al., 2013; WANG et al., 2008). Paralelamente, outros solutos também se acumulam e com isso, a água move-se para dentro das células guarda provocando aumento na sua turgescência (TAIZ e ZEIGER, 2009; ANGELOCCI, 2002).

Algumas estratégias adaptativas inerentes ao novo ambiente como por exemplo modificações na densidade estomática ou na área foliar sincronizam-se aos ajustes de crescimento e desenvolvimento, estando também envolvidos em

alterações nas atividades celulares e moleculares, visando o uso eficiente da água (EKSTEEN et al., 2014; MARTORELL et al., 2013). As respostas estomáticas à desidratação podem variar entre diferentes espécies e também dentro da mesma espécie (MOURA-SOBCZAK et al., 2011). O estresse hídrico, geralmente afeta a condutância estomática e a atividade fotossintética da folha (EKSTEEN et al., 2013; COSTA E SILVA et al., 2008). No início do estabelecimento das plantas no período de seca, a eficiência fotossintética instantânea do uso da água pode aumentar porque o fechamento parcial dos estômatos afeta tanto a transpiração quanto a absorção do CO<sub>2</sub>. No entanto, à medida que o estresse se torna mais severo, alterações no potencial hídrico vão conduzindo para a inibição das atividades normais do estômato (DIFFENBAUGH e FIELD, 2013; CATTIVELLI et al., 2008). O déficit hídrico reduz o índice de troca de CO<sub>2</sub> e a sua condução para a folha, além de reduzir a concentração desse elemento nos espaços intercelulares. Após a interrupção do déficit hídrico, esses parâmetros tendem a voltar ao normal. A recuperação completa da fotossíntese é lenta quando a planta chega próximo ao ponto de murcha permanente (PINHEIRO e CHAVES et al., 2011).

A área foliar total não permanece constante depois da maturação das folhas. Se as plantas sofrerem estresse hídrico após um grande desenvolvimento foliar, estas poderão entrar em senescência, culminando na abscisão foliar. Este ajuste da área foliar é uma mudança demorada que melhora muito a aptidão das plantas, de maneira geral, a sobreviverem em um ambiente com limitação hídrica. A abscisão durante o estresse hídrico resulta principalmente do aumento da síntese e da sensibilidade dos tecidos ao hormônio etileno (TAIZ e ZEIGER, 2009; CHAVES et al., 2004; REDDY et al., 2004). Esse mecanismo permite as plantas administrar o processo de assimilação de carbono e consumo de energia inibindo o desenvolvimento das folhas e direcionando maior porção de foto assimilados

para as raízes, que dessa forma passam a ser capazes de aumentar a captação de água no solo e a probabilidade de se desenvolver em meio a adversidade do ambiente (CORREIA et al., 2014; SPOLLEN e SHARP, 1991).

Alterações morfológicas também incluem redução na taxa de crescimento da planta que está associada ao declínio da taxa de divisão celular, redução da área foliar e diminuição da produção de matéria seca atrelado a expansão do sistema radicular para aumentar a absorção de água e manter o potencial osmótico (BARTELS E SUNKAR, 2005).

### **2.5.2 Embolismo e ajuste hidráulico**

O embolismo é caracterizado pela entrada de ar nos vasos condutores e conseqüentemente a quebra da força de tensão e coesão. Esse fenômeno impede o fluxo ascendente de seiva e para compensar essa disfunção as plantas podem usar vasos não obstruídos, durante a seca, entretanto, o número de vasos obstruídos pode ser elevado o que pode acarretar na morte da planta (TRIFILÒ et al., 2008; BROODRIB COCHARD, 2009).

O mecanismo que elucidada a relação entre o comportamento estomático e o embolismo do xilema ainda carecem de estudos para melhor compreensão muito embora algumas pesquisas apontam evidências dessa interação (SALDO et al., 2001; BRODRIBB et al., 2003; CHOAT, SACK e HOLBROOK 2007).

Apesar do conhecimento dos fatores envolvidos no embolismo, não é claro se os estômatos respondem diretamente a ele através dos efeitos da diminuição da condutância hidráulica no caule ou se está associado unicamente a perda de água total das folhas (SPERRY et al., 2002). O estresse hídrico por períodos prolongado acarreta danos que não são suficientes para impedir a

formação de embolia extensa em vasos xilemáticos resultando em perda do fluxo ascendente e a morte da planta por completo (URLI et al., 2013; CHOAT, 2013).

Um dos principais mecanismos de controle da perda de água pelas plantas é a alteração da abertura e do fechamento estomático. Esse processo pode propiciar o retardo da diminuição do potencial hídrico foliar durante períodos de estresse de curto a longo prazo (MCDOWELL et al., 2008). Em células guarda, o amido é rapidamente mobilizado pela ação sinérgica de  $\beta$ -AMILASE1 (BAM1) e  $\alpha$ -AMILASE 3 (AMY3) para promover a abertura estomática. Nas folhas, o amido tipicamente acumula gradualmente durante o dia e é degradado à noite por BAM3 (THALMANN et al., 2016).

Um dos mecanismos propostos para a recuperação do embolismo é a despolimerização de amido em açúcares simples que são usados na manutenção e recuperação de danos causados no processo de embolismo e cavitação. O mecanismo proposto para o reparo dos danos ocorre inicialmente através da captação de sinais emitidos por células da parede dos vasos condutores gerados por meio de vibrações ocasionadas pelo processo de embolismo e cavitação. Esses sinais, são transmitidos para células adjacentes estimulando a liberação e conseqüentemente o aumento da concentração do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. Essa forma de reparo desencadeia alteração no potencial osmótico tendo como principal agente a diferença de concentração causada pela despolimerização do açúcar presente nas células do parênquima radial que é reduzido a açúcares simples direcionando o fluxo de água e o conseqüentemente o preenchimento dos vasos condutores, seguindo assim a sua recuperação (LO GULLO E SALLEO, 2011).

Alguns estudos sugerem que o período de recuperação é potencializado pelo aumento nas taxas de transpiração podendo ocorrer até mesmo com taxas negativas de potencial hídrico no xilema, o que reforça a ideia da existência de

um mecanismo dependente do bombeamento de solutos em vasos de preenchimento por parênquima adjacente (ZWIENIECKI & HOLBROOK, 2009; NARDINI, LO GULLO & SALLEO 2011). A recuperação de vasos embolizados pode ocorrer com seu preenchimento se houver períodos de interrupção do estresse. Essa recuperação pode se dar em questão de horas, porém, o crescimento de novo xilema ativo leva o tempo de semanas a meses para ocorrer. O tempo de recuperação do xilema varia de espécie para espécie (BRODERSEN et al., 2010; BRODRIBB et al., 2010).

### **2.5.3 Alterações moleculares de plantas sob estresse hídrico**

Em resposta aos estímulos causados pela seca, a planta responde de maneira imediata com a síntese do fitohormônio ácido abscísico (ABA) que por sua vez causa fechamento estomático e induz a expressão de genes relacionados ao estresse. São conhecidas duas vias regulatórias para ABA, a via dependente e independente e essas vias regulam a expressão genética induzida pela seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). Essas podem ativar fatores de transcrição que, através de rotas complexas e “interações” com outros hormônios, regulam de forma direta ou indiretamente a taxa de transpiração, crescimento de raiz/parte aérea, biossíntese de antocianina, além de participar na osmorregulação, senescência e expressão enzimática do complexo anti oxidativo (fig. 1).

Em resposta ao déficit hídrico, as plantas diminuem a eficiência da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, aumentando os níveis de metabólitos associados ao estresse, tais como prolina, açúcares, glicina, glutatona e carotenóides (GUHA et al., 2010; REDDY et al., 2004). O estresse também está associado com alterações no metabolismo lipídico, incluindo a inibição de sua

biossíntese e estimulando a atividade antioxidante (BASU et al., 2010). Além disso, as reações que ocorrem nas fases fotoquímica e bioquímica da fotossíntese são muito sensíveis ao déficit hídrico (CHA-HUM et al., 2012). A condição de baixa disponibilidade de água também pode induzir respostas bioquímicas que poderão culminar no aumento da síntese de compostos antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e não enzimáticos como  $\alpha$  tocoferol, ácido ascórbico, entre outros (CATTIVELLI et al., 2008; VALLIYODAN e NGUYEN, 2006).

Adaptações estruturais, em resposta ao déficit hídrico podem acarretar em diminuição da perda de água através da redução da área foliar podendo também haver crescimento da raiz para camadas mais profundas do solo maximizando a absorção de água. A resposta das plantas à seca é acompanhada pela ativação de genes envolvidos na percepção de estresse e na transmissão de sinais, é possível a partir das respostas dos genes agrupá-los com base nas funções de seus produtos (THUMMA et al., 2012; CIARMIELLO, et al., 2009). Um grande grupo de genes encontra-se associado com a função de proteção de macromoléculas e membranas celulares (betaína, glicina, manitol e prolina), remoção de espécies reativas de oxigênio e proteção de macromoléculas (chaperonas e proteínas LEA) (Morales et al., 2013; Wani et al., 2013). Outro grande grupo consiste em genes que codificam proteínas reguladoras como proteínas quinases, fosfatases e fator de transcrição (SHINOZAKI K e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007; AGARWAL et al., 2006). Os fatores de transcrição induzidos por estresse são classificados em duas classes, ABA dependente e ABA independente.

O estudo das mudanças estruturais e também fisiológicas tem sido desenvolvido por diversos autores e as análises ao estresse podem contribuir tanto para a compreensão dos mecanismos de resposta como também auxiliar no

desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com aumento de tolerância à seca (SOMSUEB et al., 2014; TOURNIER et al., 2003).

## **2.6 Alterações moleculares de plantas em rustificação.**

A rustificação aplicada no viveiro de mudas antes do plantio pode melhorar o estabelecimento de mudas de eucalipto aumentando sua tolerância e conseqüentemente a sobrevivência quando em situação de estresse como a seca (COOPMAN et al., 2008). Esse aumento ocorre devido a ativação de um grupo complexo de genes que podem ser expressos a partir da percepção dos estímulos externos por meio de estruturas celulares ou morfo anatômicas (BHARGAVA e SAWANT, 2013).

As modificações de ajuste molecular estão diretamente relacionadas com as alterações ambientais que o regime de rustificação impõe. É sabido que, durante esse processo as mudas geralmente obtêm aumento de exposição a luz solar e devido a isso, podem ocorrer uma série de modificações nos centros de reação do fotossistema II (PSII), o que eventualmente pode levar à inibição do transporte de elétrons. Como exemplo tem-se o ajuste do tamanho da estrutura de antena por degradação de proteínas presentes no PSII, esse ajuste pode acarretar em diminuição na taxa de transporte de elétrons fotossintéticos (VASS et al., 2007). Porém, o aumento da síntese de moléculas fotoprotetoras como carotenoides pode ser observado em espécies florestais (CORREIA et al., 2016; GAO et al., 2009). Os carotenoides podem atuar inativando oxigênio reativo proveniente da hidrólise em centros de reação do PSII (KRIEGER-LISZKAY et al., 2008). A proteção contra espécies reativas de oxigênio pode também estar relacionada com o aumento da estabilidade da membrana celular (SHARMA et al., 2012).

Outra modificação ambiental que é comumente empregada durante a rustificação é a diminuição gradativa na irrigação. Esse procedimento induz a um ajuste osmótico pela síntese de solutos com função de regulação osmótica podendo ocasionar no incremento da elasticidade da parede celular que gera a manutenção do turgor das células em baixos potenciais de água nos tecidos de eucalipto (DA COSTA e HUANG 2006; GUARNASCHELLI et al., 2003). Modificações na quantidade de açúcar total também podem ser averiguadas durante a rustificação, esse ajuste pode ser crucial para a sobrevivência e crescimento das plantas em um período de seca (VILLAR-SALVADOR et al., 2004).

Outra característica bastante observada durante o período de rustificação é a diferenciação na taxa de crescimento das diferentes partes das plantas (COOPMAN et al., 2008; VILLAR-SALVADOR et al., 2004). Esse fator pode estar relacionado a atributos como aumento no diâmetro do coleto, e o potencial de crescimento radicular que são relatados como bons indicadores de sobrevivência e potencial de crescimento após o plantio (XU et al., 2011; MASON, 2001; HSIAO e XU, 2000). Morfologicamente uma das principais características observadas durante a rustificação em eucalipto é a redução da área foliar, sendo essa variável uma das mais sensíveis durante o processo (COOPMAN et al., 2014; PITA e PARDOS, 2001; COSTA e SILVA et al., 2004). A diferenciação entre as taxas de crescimento das partes aérea e radicular pode ser explicada pela manutenção do turgor das células radiculares devido ao rápido ajuste osmótico nessa região, o mesmo pode não acontecer na parte aérea, que devido a isso pode ter seu crescimento desacelerado (Hsiao e Xu, 2000).

## 2.7 Análise anatômica para estudo de déficit hídrico de plantas.

A anatomia caulinar bem como o estudo da capacidade hidráulica das plantas são pontos relevantes para a compreensão das respostas das plantas e na capacidade dessas em enfrentar déficit hídrico de curto a médio prazo (MC DOWELL et al., 2008). As relações encontradas entre a caracterização das células e os componentes acumulados por elas refletem a capacidade de espécies florestais em reagir a determinado estresse (LÜBBE et al., 2016; CURRY et al., 2015; ANDEREGG et al., 2012). Em caule de plantas submetidas ao estresse hídrico a força de tensão/coesão são enfraquecidas e por vezes rompidas causando embolismo impedindo o fluxo hidráulico ascendente, Esse dano pode ser reparado com a utilização de vasos não obstruídos (TRIFILÒ et al., 2008; SPERRY e TYREE, 1988) e também pode ser sanado com a despolimerização do amido e consequente diferenciação de pressão osmótica (LO Gullo e SALLEO, 2011).

Outro mecanismo estudado nesse estresse está relacionado metabolismo de lipídeos. Sabe-se que durante o estresse hídrico ocorre um aumento quantitativo em EROs, que por sua vez causam danos em lipídeos de membranas celulares e também em hormônios com essa natureza, através da peroxidação lipídica. Além disso, as EROs também podem degradar proteínas e DNA (Apel e Hirt, 2004; Mittler, 2004). Em espécies florestais as características deletérias de EROs foram observadas em *Eucalyptus* sp. (Bedon et al., 2012; Coscolin et al., 2011), *Tectona grandis* (Pooja et al., 2010), *Populus* sp. (Guo et al., 2010) e *Pinus densata* (Gao et al., 2009).

## 2.8 Tolerância dos diferentes materiais genéticos de eucalipto ao déficit hídrico

Distribuída em todo território nacional, a cultura do eucalipto apresenta limitações de acordo com os diferentes níveis de estresse que impõe determinado clima. Pesquisas mostram a existência de uma diferenciação entre clones de eucalipto sob estresse hídrico (CHA-UM et al., 2011). Algumas mudanças podem ser notadas no potencial hídrico do xilema. Por exemplo, *Eucalyptus globulus* e híbridos de *Eucalyptus globulus* x *Eucalyptus nitens* aumentam o prazo para alcançar um período crítico de pressão no xilema (NAVARRETE-CAMPO et al., 2013).

A espécie *Eucalyptus grandis* é altamente produtiva e a mais plantada em todo o mundo, especialmente na zona subtropical (HARWOOD, 2011; GONÇALVES et al., 2013). Da mesma forma, a espécie *Eucalyptus urophylla* é muito cultivada no Brasil, devido ao seu rápido desenvolvimento e tolerância ao déficit hídrico (SCANAVACA e GARCÍA, 2003; FERREIRA, 1992).

Os mecanismos desenvolvidos pelo *Eucalyptus grandis* em resposta ao estresse hídrico ainda são poucos estudados (BATTIE-LACLAU et al., 2014). Algumas alterações específicas presentes em algumas espécies associadas ao estresse hídrico indicam a existência de diferentes estratégias no gênero *Eucalyptus*. Por exemplo, eucalipto urograndis, quando submetido à seca diminui a quantidade de lignina nas regiões apicais do caule e aumenta na região basal. O *Eucalyptus globulus* apresenta comportamento oposto (QUANG et al., 2011; MOURA-SOBCZAK et al., 2011). Mais informações acerca dos mecanismos biológicos usados para lidar com o estresse devem ser elucidadas e para isso faz-se necessário mais pesquisas para a compreensão dos mesmos.

### 3 Referências Bibliográficas

AGARWAL P.; et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Rep**, State College, v. 25, p. 1263–1274, 2006.

AKHTAR I.; NAZIR N. Effect of waterlogging and drought stress in plants. **Int J Water Res Environ Sci**, Gujrat, v. 2, p. 34-40, 2013.

ANDEREGG W R L.; et. al. The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. **Proc Natl Acad Sci**, Princeton, v. 109, p. 233-237, 2012.

ANGELOCCI, L. R. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba, Edição do autor. 284, 2002.

APEL K.; HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, Zurich , 55, 373-399, 2004.

ASADA K. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiol Plant**, 85, 235-41, Kyoto, 1992.

ASSAD, E. D.; et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Campinas, 1, 1057-1064, 2004.

BARTELS D.; SUNKAR R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit Rev Plant Sci**, Kirshallee, 24, 23-58, 2005.

BASU.; et al. Differential antioxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, Zurich, 60, 51-59, 2010.

BATTIE-LACLAU.; et al. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. **New Phytol**, Piracicaba, v. 203, p. 401-13, 2014.

BEDON, F.; et al. Proteomic plasticity of two *Eucalyptus* genotypes under contrasted water regimes in the field. **Plant, Cell and Environment**, Bordeaux, v.35, p. 790 – 80, 2012.

BHARGAVA S.; SAWANT K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, Savitribai, v. 132, 21-32, 2013.

BRAZILIAN ASSOCIATION of PLANTED FOREST PRODUCERS (ABRAF): Annual report. Brazil. 2013. <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF13-EN>. Acessado em 22 Nov 2015.

BRESSAN R.A.; HASEGAWA P.M.; PARDO M. Plants use calcium to resolve salt stress. **Trends in Plant Science**, Madrid, v. 3, p. 411-412, 1998.

BRODERSEN C. R.; et al. The dynamics of embolism repair in xylem: in vivo visualizations using high-resolution computed tomography. **Plant Physiology**, California, v. 154, p. 1088-1095, 2010.

BRODRIBB, T. J.; COCHARD, H. Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 575-584, 2009.

CARNEIRO, J. G. A Produção e controle de qualidade de mudas florestais. **UFPR-FUPEF**, Curitiba, UNEF, 1995.

CARPANEZZI, A. A. Fundamentos para a reabilitação de ecossistemas florestais. Restauração florestal: fundamentos e estudos de caso. **Embrapa Florestas**, Colombo, v. 1, p. 27 - 45, 2005.

CARVALHO, A.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; CARMO, M. G. F. Resistance of *Eucalyptus* species, progênies and proven ancesto *Puccinia psidii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Piracicaba, v. 33, p. 139-147, 1998.

CATTIVELLI, L. et al. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v.105, p.1 - 14, 2008.

CHA-UM SURIYAN.; KIRDMANEE. Chalernpol. Remediation of salt-affected soil by the addition of organic matter: an investigation into improving glutinous rice productivity. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 4, p. 406 - 410, 2011.

CHAVES, J. H.; et al.. Q. Seleção precoce de clones de eucalipto para ambientes com disponibilidade diferenciada de água no solo. Relações hídricas de plantas em tubetes. **Revista Árvore**, Lavras, MG, v. 28, p. 333-341, 2004.

CHOAT B. Predicting thresholds of drought-induced mortality in woody plant species. **Tree Physiology**, Sydney, v. 33, p. 669–671, 2013.

CHOAT B.; SACK L.; HOLBROOK N. Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical rainforests with contrasting precipitation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p. 686-698, 2007.

CHRISTOPHE, S.; et al. Plant N Fluxes and Modulation by Nitrogen, Heat and Water Stresses: A review based on comparison of legumes and non-legume plants. **INRA**, v. 1, p. 307-314, 2007.

CIARMIELLO, L. F.; et al. Plant Genes for Abiotic Stress. **CRA**, Venkateswarlu, v. 1, p. 215-231, 2009.

COOPMAN, R. E.; et al. Changes in morpho-physiological attributes of *Eucalyptus globulus* plants in response to different drought hardening treatments. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 11, p. 1-10, 2008.

CORREIA, B. et al. Integrated proteomics and metabolomics to unlock global and clonal responses of *Eucalyptus globulus* recovery from water deficit. **Metabolomics**, NY, v.12, p. 141-153, 2016.

CORREIA, B.; et al. Hormonal dynamics during recovery from drought in two *Eucalyptus globulus* genotypes: From root to leaf. **Plant Physiology and Biochemistry**, Aveiro, v. 82, p. 151–160, 2014.

CORREIA, B.; et al. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: Physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, Aveiro, v. 150, p. 580–592, 2014b.

COSCOLIN, J. F.; et al. Response of *cucumis sativus* L. seedlings to Pb exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 21, p. 175-186, 2009.

COSTA e SILVA; et al. Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought tolerance. **Tree Physiol**, Tapada da ajuda, v. 29, p. 77-86, 2008.

COSTA e SILVA, F.; et al. Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. **Tree Physiol.**, Tapada da ajuda, v. 24, 1165-1172, 2004.

CURRY; et al. Woody biomass production lags stem-girth increase by over one month in coniferous forests. **NATURE PLANTS**, Chapenoux, v. 1, p. 1-6, 2015.

DA COSTA, M.; HUANG B. Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** New Brunswick, v. 131, p. 338-344, 2006.

DAT, J.; et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell. Mol. Life Sci.** Amsterdam, v. 57, p. 779-795, 2000.

DEL RIO L. A.; et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiol.** Granada, 141:330–335, 2006.

DIFFENBAUGH, NOAH S.; FIELD, CHRISTOPHER B. Changes in ecologically critical terrestrial climate conditions. **Science**, Stanford, v. 341, p. 486-492, 2013.

DINAKAR C.; et. al. Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. **Planta**, Hyderabad, v. 231, p. 461-474, 2010.

DRANSKI, J.; et al. Effect of ethephon on hardening of *Pachystroma longifolium*. **Árvore**, Paraná, v. 37, p. 401-407, 2013.

EKSTEEN, A. B.; GRZESKOWIAK, V.; JONES, N. B.; PAMMENTER, N. W. Stomatal characteristics of *Eucalyptus grandis* clonal hybrids in response to water stress. **Southern Forest**, Durban, v. 3, p. 37–41, 2014.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Ed. 1, Colombo: EMBRAPA, 2004.

FERREIRA, M. Melhoramento e silvicultura clonal. **IPEF**, Piracicaba, v. 45, p. 22-30, 1992.

FREEMAN, J. S.; POTTS, B.; VAILLANCOURT, R. E. Few mendelian genes underlie the quantitative response of a forest tree, *Eucalyptus globulus*, to a natural fungal epidemic. **Genetics**, Tasmania, v. 178, p. 563-571, 2008.

FUJITA M.; et al., A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant J**, Ohwashi, v. 39, p. 863-876, 2004.

GAO, D.; et al. Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species. **Trees**, Lanzhou, v. 23, p. 717-728, 2009.

GONÇALVES, J. L. M.; et. al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6 – 27, 2013.

GUARNASCHELLI A. B.; et al. Responses to drought preconditioning in *Eucalyptus globulus* Labill. **Trees**, Buenos Aires, v. 17, p. 501-509, 2003.

GUIDI, L. e DEGLINOCENT **Imaging of Chlorophyll a Fluorescence : A Tool to Study Abiotic Stress in Plants**. 1 Ed. Pisa: Shanker e Venkateswarlu, 2008.

GUHA, A.; et al. An integrated diagnostic approach to understand drought tolerance in mulberry (*Morus indica* L.). **Flora**, Hyderabad, v. 205, p. 144-151, 2010.

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**, Beijing, v. 3, p. 79-87, 2010.

HARTMAN, H.; KESTR, D. E; AVIS JUNOR, F. T.; GEN R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. Ed. New Jersy: Prentice-Hall, 2002.

HARWOOD, C. Developing a Eucalypt Resource. Learning from Australia and Elsewhere. **Wood Technology Research**, Canterbury, v.1, p. 43-54. 2011.

HSAIO, T. C.; Xu L. K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **J. Exp. Bot**. Beeijing, v.51, p. 1596-1616, 2000.

HUANG, M. D.; CHEN, T. L. L.; HUANG, A. H. C. Abundant type III lipid transfer proteins in Arabidopsis tapetum are secreted to the locule and become a constituent of the pollen exine. **Plant physiology**, Shanghai, v. 163, p. 1218-29, 2013.

IBÁ. **Relatório Anual**. 1 Ed. Palmas: Indústria Brasileira de Árvores, 2016.

IUCHI, S.; et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9- cis - epoxy-carotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis. **Plant J**. Kyoto, v. 27, p. 325-333, 2001.

KOLUPAEV, YU.E.; KARPETS, YU.V., **Formation of Adaptive Plant Responses to Abiotic Stresses**, 1 Ed. Kiev: Osnova, 2010.

KRIEGER-LISZKAY A.; FUFUZAN, C.; TREBST, A. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. **Photosynthesis Res**. V. 98, p. 251-262, 2008.

KULKARNI, M.; BORSE, T.; CHAPHALKAR, S. Mining anatomical traits: A novel modelling approach for increased water use efficiency under drought conditions in plants. **Plant Breed**, Czech v. 44, p. 11-21, 2008.

LOPES, J. L. W. **Qualidade de mudas clonais do híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla*, submetidas a diferentes regimes hídricos**. p.171. Tese (Doutorado em Agronomia/Irrigação e Drenagem), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

LÜBBE T.; SCHULDT B.; LEUSCHNER C.; Acclimation of leaf water status and stem hydraulics to drought and tree neighbourhood: alternative strategies among the saplings of five temperate deciduous tree species. **Tree Physiology**, Breenam, v. 81, p1–13, 2016.

MARTORELL, S. et al. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: Linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange. **Plant, Cell and Environment**, Kentucky, v. 37, p. 617–626, 2014.

MASON, E.G. A model of the juvenile growth and survival of *Pinus radiata* D. Don-Adding the effects of initial seedling diameter and plant handling. **New Forests**., Bordeaux, vol. 22, p. 133-158, 2001.

MCDOWELL, N. et al. Mechanisms of Plant Survival and Mortality during Drought : Why Do Some Plants Survive while Others Succumb to Drought ? **Tree Physiology**, California, v. 178, p. 719–739, 2008.

MITTLER R, et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci**, Ontario, v. 9, p. 490–498, 2004.

MORALES C. G.; PINO M. T.; DEL POZO A (2013) Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. **Sci Hortic**, Buenos Aires, v. 162, p.234–241

MORONI, M. T.; WORLEDGE, D.; BEADLE, C. L. Root distribution of *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* in irrigated and droughted soil. **Forest Ecology and Management**, Tasmania, v. 177, p. 399 - 407, 2003.

MOURA-SOBCZAK, J.; SOUZA, U.; MAZZAFERA, P. **IUFRO Tree Biotechnology in Conference: From Genomes to Integration and Delivery**, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/S7/P103/>> Acessado em 07/12/2014.

MURO ABAD, J. I. **Método de melhoramento, assistido por marcadores moleculares, visando à obtenção de híbridos de *Eucalyptus spp.*** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2000.

NARDINI A.; LO GULLO M.A.; SALLEO S. Refilling embolised xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? **New Phytologist**, Triest, 138, 327–342, 2011.

NAVARRETE-CAMPOS, D.; et al. Effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* × *nitens* cuttings. **New forests**, Casilla, v. 44, p. 119-134, 2013.

PEUKE, A. D.; SCHRAML, C.; HARTUNG, W.; RENNENBERG, H. Identification of drought-sensitive beech ecotypes by physiological parameters. **New Phytologist**, Breisgau, v. 154, p. 373-387, 2002.

PINHEIRO, C. E.; CHAVES, M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Lisboa, v. 62, p. 869-882, 2011.

PITA; Pilar e PARDOS; José A. Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. **Tree Physiology**, Amsterdam, vol. 21, p. 599-607, 2001.

POOJA et al. FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF TECTONA GRANDIS ROOTS. **IJPSR**, Rajasthan, V. 1, p. 159-163, 2010.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Cairo, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RHIZOPOULOU, S.; PSARAS, G.K. Development and structure of drought-tolerant leaves of the mediterranean shrub *Capparis spinosa* L. **Annals of Botany**, Atenas, v. 92, p. 377-383, 2003.

SALATI, E.; SANTOS, A.A.; NOBRE, C. **As mudanças climáticas globais e seus efeitos nos ecossistemas brasileiros**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima14.htm>> Acesso em: 6 dez. 2014.

SCANAVACA JUNIOR L.; GARCÍA JN. Potencial de melhoramento genético em *E. urophylla* procedente de Ilha Flores. **Scientia Forestalis**, São Paulo, v. 64, p. 23-32, 2003.

SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT, H. J.; NGUYEN, T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, Missouri, v. 55, p. 2343-2351, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Yokohama, vol. 58, p. 221-227, 2007.

SILVEIRA, R. L. V. A.; MALAVOLTA, E. **Nutrição e adubação potássica em *Eucalyptus***. 1 Ed. Piracicaba, Potafos, 2000.

SOMSUEB, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Screening of Eight Eucalypt Genotypes (*Eucalyptus* sp.) **Appl Biochem Biotechnol**, Pathun Thani, 2014.

SPERRY J. S.; HACKE U. G.; OREN R.; et al. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. **Plant Cell Environ**, Durham, v. 25, p.251–263, 2002.

SPOLEN, W. G.; SHARP, R. E. Spatial distribution of turgor and root growth at low water potentials. **Plant Physiology**, Missouri, v.96, p. 438-443, 1991.

SUSILUOTO, S.; BERNINGER, F. Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. **Silva Fenn**, Helsinki, v. 41, p. 221-233, 2007.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEIXEIRA, J. E. C.; et al. **Análise da herança da resistência a *Puccinia psidii* em progênies de híbridos interespecíficos de eucalipto avaliadas sob condições naturais de infecção**. Tese (Doutorado em agronomia), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

TEIXEIRA, F. K.; et al. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. **Genetics and Molecular Biology**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 529-538, 2005.

THALMANN M.; et al. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Advance**, Zürich, v. 29, p. 532-543, 2016.

THOMAS, C. D.; et al. Extinction risk from climate change. **Nature**, Oxford, v.427, p.145-148, 2004.

THOMAS, D. S. Survival and growth of drought hardened *Eucalyptus pilularis* Sm. seedlings and vegetative cuttings. **New Forests**, Jonesburg, v. 38, n. 3, p. 245-259, 2009.

THUMMA B. R.; SHARMA N.; SOUTHERTON S. G. Transcriptome sequencing of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings subjected to water stress reveals functional single nucleotide polymorphisms and genes under selection. **BMC Genomics**, Acton, v. 13, p. 364-373. 2012.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; KAYAL, W.E.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. An Efficient Procedure to Stably Introduce Genes into an Economically Important Pulp Tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, V. 12 p. 403-411, 2003.

TRIFILÒ, P.; et al. Xylem embolism alleviated by ion mediated increase in hydraulic conductivity of functional xylem: insights from field measurements. **Tree Physiology**, Lancaster, v. 28, p. 1505-1512. 2008.

URLI M., PORTE A., COCHARD H., GUENGANT Y., BURLETT R. & DELZON S. et al. Xylem embolism threshold for catastrophic hydraulic failure in angiosperm trees. **Tree Physiology**, Cestas, v. 33, p. 672-683, 2013.

VALDÉS, A. E. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of proteomics**, Asturias, v. 79, p. 263–76, 2013.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Plant Biology**, Columbia, v. 9, p. 189-195, 2006.

VILLAR-SALVADOR, P.; et. al.. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. **Tree Physiology**, Madrid, 24, 1147–1155 , 2004

WANI SH, SINGH NB, HARIBHUSHAN A, MIR JI. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance role of glycine betaine. **Current Genomics**, Paris, v. 14, p. 157–165. 2013.

WARREN, C. R.; ARANDA, I.; CANO, F. J. Effects of drought on mesophyll conductance and photosynthetic limitations at different tree canopy layers **Metabolomics**, Madrid, v. 8, p. 186-200. 2002.

WASILEWSKA A.; et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more. **Molecular Plant**, Paris, v.1, p. 198–217, 2008.

WENDLING, I.; et al. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24. p. 187–192, 2000.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto por sementes**. 1 Ed. Colombo: EMBRAPA, 2010.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A. **Clonagem de espécies florestais nativas**. In ROCHA, M. G. B. *Melhoramento de espécies arbóreas nativas*. 1 Ed. Minas Gerais: Instituto Estadual de Florestas, 2002.

XOCONOSTLE-CÁZARES, et al. Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, Zacatenco, v. 5, p. 1–16, 2010.

XU, J.; E CHUA N. H. Processing bodies and plant development. **Curr. Opin. Plant Biol**, Beijing, v. 14, p. 88–93, 2011.

YADOLLAHI, A.; ARZANI, K.; EBADI, A.; WIRTHENSOHN, M.; KARIMI, S. The response of different almond genotypes to moderate and severe water stress in order to screen for drought tolerance. **Scientia Horticulturae**, Tehran, v. 129, p. 403–413. 2011.

ZIDA D.; TIGABU M.; SAWADOGO L.; et al. Initial seedling morphological characteristics and field performance of two Sudanian savanna species in relation to nursery production period and watering regimes. **For Ecol Manag**, Umea, v. 255, p.2151–62, 2008.

ZWIENIECKI M. A.; Holbrook N. M. Confronting Maxwell's demon: biophysics of xylem embolism repair. **Trends in Plant Science**, Cambridge, v. 14, p. 530–534, 2009.

## **CAPÍTULO 2: Respostas fisiológicas e moleculares no híbrido urograndis (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) durante a rustificação**

### **RESUMO:**

A produção de mudas constitui-se numa das mais importantes atividades do setor florestal. A fase final da produção de mudas consiste na rustificação. Durante esse processo as mudas são condicionadas em pleno sol com alterações no regime de irrigação e fertilização com KCl. Pretendeu-se nesse trabalho, analisar modificações fisiológicas e moleculares no híbrido urograndis (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) clone VE06 durante o período de rustificação que teve duração de 30 dias. Partindo da premissa de que essa prática induz ao condicionamento das mudas para o plantio e para o enfrentamento de eventuais modificações ambientais que possam vir a causar estresse pós plantio. Dessa forma, foram realizadas avaliações de trocas gasosas, potencial hídrico foliar e a quantificação de clorofila total. Foram realizadas também análise da deposição de amido em secções de caule e atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR). Foi verificado que mudas em rustificação apresentaram ajuste osmótico com diminuição em todas as variáveis fisiológicas estudadas com exceção da *EUA*. Nas análises de deposição de amido foi averiguado acúmulo dessa substância ao longo da rustificação e aumento da atividade para todas as enzimas analisadas. Pode-se perceber que o eucalipto urograndis ajustou padrões fisiológicos e moleculares durante a rustificação, as quais podem melhorar a resposta das mudas após o plantio.

Palavras-chave: Rustificação, eucalipto urograndis, Silvicultura

## ABSTRACT

Seedlings production is one of the most important activities of the forestry production. Hardening is the last step in seedling production. During this process seedlings are exposed at full sun with changes in the irrigation and KCL fertilization schedule. The present work aimed to study the physiological and molecular changes in the urograndis (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) clone VE06 during 30 days of hardening. Based on the premise that this practice induces conditioning and prepare seedling to cope with environmental changes that may cause stresses. Thus, this research focused on evaluations of gas exchange, leaf water potential and total chlorophyll quantification. It was also evaluated the deposition of starch in stem sections and the activity of anti-oxidants enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR). It was verified in seedlings during hardening an osmotic adjustment with decrease in all the physiological variables, except for the *EUA*. It was verified the accumulation of starch and anti-oxidant enzymes throughout the hardening period. It was possible to notice that eucalypt urograndis present a physiological and molecular adjustment during the hardening and these modifications can possibly contribute to a good development of the seedlings.

Key words: Hardening, eucalypt urograndis, Silviculture

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar das variações na temperatura e do aumento na frequência de ocorrência de veranicos no Brasil (BITENCOURT et al., 2016), o problema causado pelo estresse hídrico é comumente enfrentado pelas plantas ao longo de sua evolução. Mecanismos de resposta a esse estresse têm sido evoluído ao longo das gerações e atualmente sabe-se que eles podem ser ativados ou estimulados com o uso de procedimentos usados na produção de mudas (GÓMEZ-RUIZ et al., 2016; DRANSKI et al., 2013; XOCONOSTLE-CÁZARES et al., 2010). Atualmente a exploração de áreas inapropriadas para o cultivo de eucalipto tem crescido (IBÁ, 2016), fazendo necessário avanços científicos e tecnológicos em produção de mudas.

Em se tratando de mudas de espécies florestais um processo comumente utilizado em viveiros é a rustificação das mudas. Esse procedimento consiste em alterar, ao final do ciclo, a quantidade e frequência de irrigação e modificações na adubação de cobertura, podendo ser usadas soluções de potássio ( $K^+$ ). O manejo desses recursos é importante no crescimento e em processos fisiológicos das plantas, como ajuste osmótico foliar (WANG et al., 2013; CAKMAK 2005), regulação de abertura estomatal (COCHRANE e COCHRANE, 2009) e controle do estresse oxidativo (WANG et al., 2013), contribuindo para aumentar a sobrevivência quanto a estresse biótico e abiótico, podendo ser efetuado no sentido de condicionar a planta à situação ideal para o plantio (WANG et al., 2013; CAKMAK, 2005).

É importante salientar que para a otimização do reflorestamento em áreas susceptíveis a condições de seca prolongada, as mudas devem estar preparadas para enfrentar tais intempéries. Dessa forma, a implementação da floresta, pode desacelerar o processo de degradação ou até mesmo recuperá-lo (HUANG et al., 2013). Sendo assim, pretendeu-se avaliar o híbrido *urograndis* (*Eucalyptus*

*grandis* x *Eucalyptus urophylla*), clone VE06 escolhido devido ao fato desse material ser descrito como um material com grande plasticidade ambiental, se adaptando a diferentes regiões e situações de estresse, bem como por esse ser bastante produzido no Brasil. Assim sendo, objetivou-se com o presente trabalho, analisar as alterações fisiológicas e moleculares durante a rustificação de mudas do híbrido *urograndis* (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*).

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local e clima**

O experimento foi conduzido no viveiro florestal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), (latitude 21° 14' S e longitude 45° 00' W ) durante os dias 01 a 30 do mês de agosto de 2016, no município de Lavras, que está localizado na região sul do Estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude,

Segundo a classificação climática de Köppen, o clima regional é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso. De acordo com dados da estação meteorológica da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada a 1 km de distância do viveiro, para o mês de Julho de 2016 (fig. 2), durante esse período não houve registros de precipitação e a velocidade do vento variou entre 1 a 6m/s .

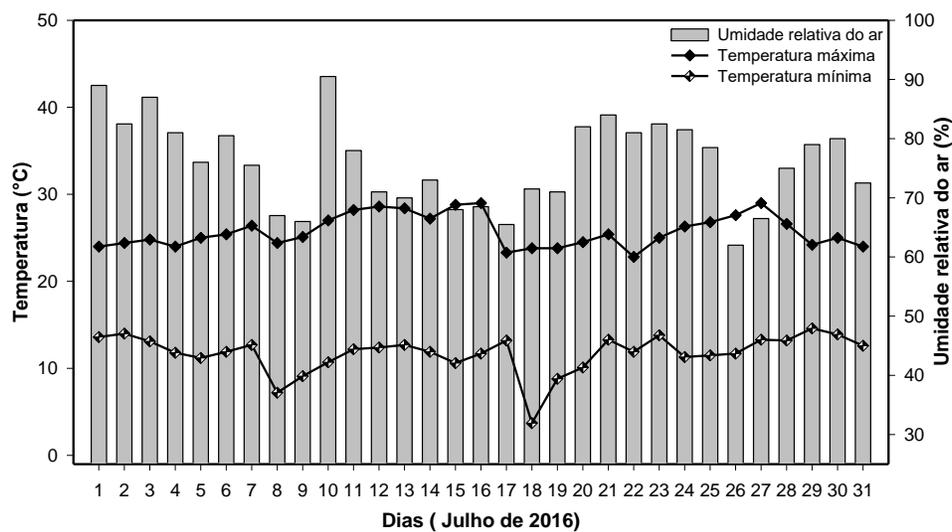


Figura 2: Dados climatológicos da estação meteorológica da UFLA no mês de julho de 2016.

## 2.2 Material biológico e rustificação

Mudas não rustificadas do híbrido urograndis (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*), clone VE06 foram obtidas na empresa Esteio, localizada no município de São João Del-Rei, Minas Gerais, produzidas no sistema clonal convencional, em tubetes de 53 cm<sup>3</sup>. As mudas com aproximadamente 60 dias, foram transportadas para o Viveiro Florestal da UFLA e colocadas em dois locais. Metade foi mantida em casa de sombra revestida com sombrite (50% de bloqueio de raios solares), com sistema de irrigação automático por aspersão ativado de hora em hora, com duração de 2 minutos em cada ativação das 7:00 às 17:00 , diariamente.

Durante o período que as mudas permaneceram nesse local foi realizada a fertirrigação com fosfato monoamônico,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , (MAP),  $10\text{g.L}^{-1}$  (Rocha et al., 2015) semanalmente. Outro grupo de mudas foi colocado em bancadas suspensas, em área de pleno sol, onde foram submetidas ao tratamento de rustificação. Para tal, realizou-se a diminuição gradativa da irrigação, inicialmente as mudas eram irrigadas 4 vezes ao dia com duração de 3 minutos, após 5 dias nesse regime era alterado, reduzindo uma irrigação até ficarem sendo irrigada uma única vez ao dia. De 3 em 3 dias era realizado fertilização das mudas através da imersão dos tubetes em solução de KCl na dosagem de  $1,5\text{g.L}^{-1}$  até a completa saturação do substrato (BATTIE-LACLAU, et al., 2014; IMSANDE E RALSTON, 1981). Para evitar danos as raízes das plantas, realizou-se a avaliação da condutividade das soluções, utilizando um condutivímetro da marca HANNA (HI 98312). Verificou-se que em ambas as soluções usadas a condutividade foi menor que  $2\text{ mS cm}^{-1}$ .

### 2.3 Análises fisiológicas

Em intervalos regulares (5 em 5 dias) foram mensurados, em 4 mudas de cada tratamento: taxa fotossintética foliar ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), transpiração ( $E$ ) e eficiência instantânea do uso da água ( $A/E$ ). Para tal foi utilizado um analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA) em folhas completamente expandidas (segundo par de folhas). Todas as avaliações foram realizadas entre 8 e 9 horas da manhã (horário solar) com utilização de fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em  $600\ \mu\text{mol de fótons m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA), (JESUS, 2014; TEIXEIRA, 2012). Para essa análise foi utilizada a mesma

folha ao longo de todo o experimento. Essas foram marcadas para medições futuras, sendo feita uma leitura por dia para cada folha marcada.

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) máximo e mínimo foi mensurado utilizando quatro indivíduos de cada tratamento, escolhidos aleatoriamente sempre nos mesmos horários, às 5 e 12 horas respectivamente, em folhas totalmente expandidas (segundo par de folhas), utilizando uma bomba de pressão de Scholander portátil marca Soilmoisture modelo SEC-3115-P40G4V.

A quantificação de clorofila total foi realizada com uso do clorofilometro Atleaf (FT Green LLC). As mensurações foram feitas nos dias 0, 4, 9, 14, 18, 24, 28 e 30, sendo utilizadas quatro plantas de cada tratamento e de cada uma, três folhas foram usadas sem serem destacadas. A mensuração foi feita a partir da leitura de cinco pontos nas folhas (2 próximos ao pecíolo, 2 centralizados e 1 no ápice foliar). A conversão do índice SPAD para clorofila total foi realizada no site da empresa (NOVICHONOK, et al., 2016).

#### **2.4 Análises anatômicas**

Durante a rustificação, cinco mudas de cada tratamento foram selecionadas ao acaso nos dias 0,15 e 30, para a coleta do caule, o qual foi armazenado, separadamente, em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e álcool 50%) por três dias em tubos de 50 ml. Após esse período, a solução foi trocada para álcool 70% e armazenadas em temperatura ambiente. Foi selecionada a porção inicial do coleto próximo a raiz para a realização de cortes transversais com 8 $\mu$ m de espessura, utilizando um micrótomo de mesa do tipo deslize (Ciencor/500 Push-pull). Para cada uma das mudas, foram realizados seis cortes transversais, os quais foram corados em lugol (Iodo 5%, iodeto de potássio 10% e água purificada q.s.p.). As lâminas foram montadas para a rápida visualização

do material. Para a visualização das lâminas foi utilizado o software wincell (Regent Instruments Inc., versão Pro 2001a) que registrou as imagens feitas pela câmera PixeLINK® (PL-A662) acoplada a um microscópio OLYMPUS® (BX41). Para a visualização e caracterização da deposição de amido foram feitas oito fotos de 20x de cada uma das repetições.

## **2.5 Enzimas antioxidantes**

Para as análises enzimáticas, foram coletadas todas as folhas completamente expandidas de quatro mudas de cada tratamento. No momento da coleta as folhas das quatro plantas foram colocadas em um tubo plástico tipo Falcon (50 ml), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas com auxílio de espátula esterilizada para a homogeneização das mesmas. 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 o protocolo de Biemelt et al., (1998), sendo utilizado 0,2 g de cada amostra previamente triturada, as quais foram maceradas em nitrogênio 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 (pH7,8), EDTA 0,1 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,01 M e 22 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). A amostra foi então centrifugada a 15.000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e mantido a -80°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, fazendo-se a diluição das amostras em 1:50 (v/v).

### 2.5.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A análise da atividade da enzima SOD, foi realizada conforme o protocolo de Giannopolitis e Ries (1977) e está baseada na capacidade dessa enzima em inibir a fotorredução do reagente azul de nitrotetrazolito (NBT). Dessa maneira, 3µl da amostra extraída e diluída (1:50) foram adicionados ao meio de incubação (NBT 75 µM, EDTA 0,1 µM, metionina 14 mM, fosfato de potássio 50 mM), (pH 7,8) e riboflavina 2 µM em poços individualizados em placa para espectrofotômetro de plástico com fundo redondo. Em seguida as reações foram iluminadas por uma lâmpada fluorescente 20W durante 7 minutos e a leitura no espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 560 nm. A atividade específica foi dada em Unidade de SOD mg<sup>-1</sup> proteína.

### 2.5.2 Catalase (CAT)

Para análise da atividade da enzima CAT, seguiu-se o protocolo de Havir e McHale (1987), sendo utilizado tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) aquecido em banho maria a 30°C. Antes da leitura foi adicionado peróxido de hidrogênio 12,5 mM para o início da reação. A leitura foi realizada em placas da marca *Corning* modelo half área, 96 poços. Foram usados 9 µl das amostras diluída 1:50 (v/v) em triplicatas para reação com o tampão de incubação sendo a leitura, no comprimento de onda de 240 nm, realizada de 15 em 15 segundos, durante 3 minutos. Foi observado, ao longo do tempo um decréscimo na absorbância monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio sendo o coeficiente de extinção molar de 36mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A atividade enzimática foi dada por µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

### 2.5.3 Monodehidroascorbato (MDHAR)

Para análise da atividade da enzima monodehidroascorbato (MDHAR), seguiu-se o protocolo de Hossain et al, (1984), no qual 20 µl da amostra diluída (1:50) foi adicionado ao tampão tris Hcl 50mM, ascorbato 2,5mM. O tampão foi previamente aquecido em banho Maria a 30°C. Momentos antes da leitura foi adicionado 5 µl de NADH 0,1mM. A leitura foi realizada em placas tipo *corning half-area*, com 96 poços no comprimento de onda de 340 nm feito de 15 em 15 segundos, durante 3 minutos. Foi observado, ao longo do tempo a redução na absorbância pela formação de ascorbato, o coeficiente de extinção molar utilizado foi  $6.2\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  e a atividade específica foi dada por  $\mu\text{mol de ascorbato (AsA) min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  de proteína)

### 2.5.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) em um esquema fatorial duplo, 2 condições (não rustificadas e em rustificação) x tempo. Os dados avaliados foram submetidos à análise das pressuposições (teste de normalidade Shapiro-wilk) com uso do software Minitab (17.1), em seguida foram analisados por análise de variância (ANOVA). Quando verificadas diferenças significativas pelo teste F a 5% de significância foi aplicado o teste de média Tukey a 5% de significância utilizando o software SISVAR 5.6.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A redução no potencial hídrico foliar observada durante a rustificação está relacionada à diminuição da irrigação e pode estar associada ao aumento do uso

eficiente da água, uma vez que esse parâmetro pode ser mensurado a partir do acúmulo de matéria seca pela quantidade de água consumida em determinado período (SHAO et al., 2008). Foi observado em mudas em rustificação uma diminuição progressiva na média dos potenciais hídrico foliar alcançando valores próximos a -0,5 MPa. Foi verificado que mudas não rustificadas foram aptas a se manter dentro dessa condição durante todo o experimento apresentando média entre a variação dos potenciais de -0,2 MPa com  $\sigma$  de 0,07 MPa, sendo evidenciada pela manutenção da distância entre as curvas de  $\Psi_w$  mínimo e máximo (fig. 3).

Foi observado que em mudas sob rustificação o  $\Psi_w$  diminuiu com média entre os potenciais de -0,23 MPa no primeiro dia para -0,48 MPa no último, com  $\sigma$  de 0.0132 e 0.052 MPa, respectivamente.

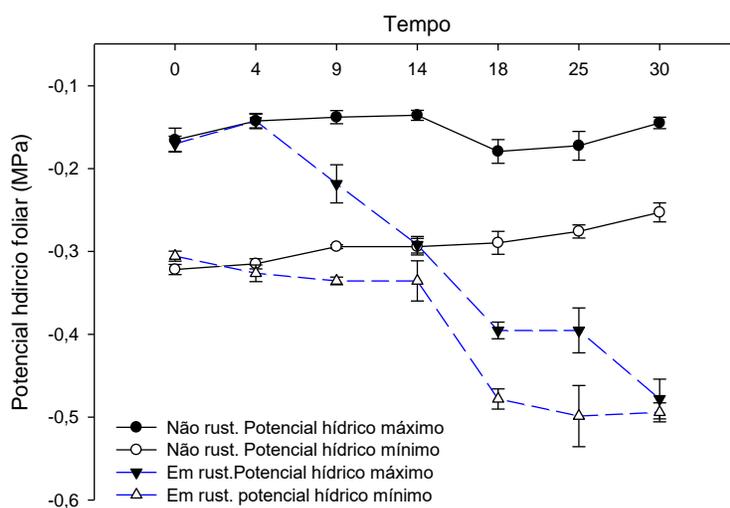


Figura 3: Curvas de potencial hídrico foliar em mudas não rustificadas e em rustificação. Barras indicam o erro padrão (n=4).

COOPMAN et al, (2008) ao analisarem a aclimação em *Eucalyptus globulus* encontraram para os tratamentos de mudas rustificadas valores de -0,2 MPa com surgimento de mortalidade quando os valores de potencial hídrico foram inferiores a -1,3 MPa. Villar-Salvador et al. (2004) analisando a rustificação em carvalho (*Quercus ilex*), ao comparar diferentes regimes de aclimação, em que os potenciais hídricos variaram de -0,27 a -1,28 Mpa, concluíram que variações no prolongamento da aclimação não aumentaram a sobrevivência nem o crescimento das mudas plantadas em condições de restrição hídrica. No caso do clone estudado, além da restrição hídrica durante a rustificação, foi realizado o aumento do espaçamento entre os tubetes, aumentando a exposição das mudas à insolação e ao vento, aumentando a camada limítrofe, além da fertilização de cobertura, mediante a aplicação de KCl a cada 3 dias. Segundo Huang et al., 2013; Shen 2013; Costa e Silva et al., 2004, o  $\Psi_w$  foliar é uma eficiente variável para a identificação do estado hídrico das plantas. É possível comparar diferentes grupos analisando o  $\Psi_w$  máximo e mínimo, avaliando-se a diferença entre os valores das curvas.

Nesse trabalho foi possível verificar que tanto mudas em rustificação quanto não rustificadas apresentaram aumento na taxa da eficiência do uso da água (*EUA*) (fig.4), com diferenças significativas dentro das condições, tempo e da interação condição\*tempo ( $P < 0,001$ ). A *EUA* de mudas em rustificação diferenciaram das mudas não rustificadas, pelo teste de média, nos dias 9 com médias variando de 4,37 ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) para mudas em rustificação e 3,10 ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) em mudas não rustificadas e no dia 18 no qual mudas em rustificação obtiveram média de 8,05 ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) e mudas não rustificadas apresentaram média de 4,21. Foi observado queda na taxa de *EUA* entre o período do dia 9 a 14. Esse fato pode ser explicado devido a baixas

temperaturas observada no período (fig. 2). Apesar disso, após o dia 14, é possível verificar um novo aumento da variável para as mudas em rustificação, com uma nova redução no dia 18, essa queda pode ser explicada pela semelhança entre as curvas de potencial hídrico mínimo e máximo (fig.3), que pode ser caracterizado como estresse (GOMES et al, 2004; WILLIAMS e ARAÚJO, 2002).

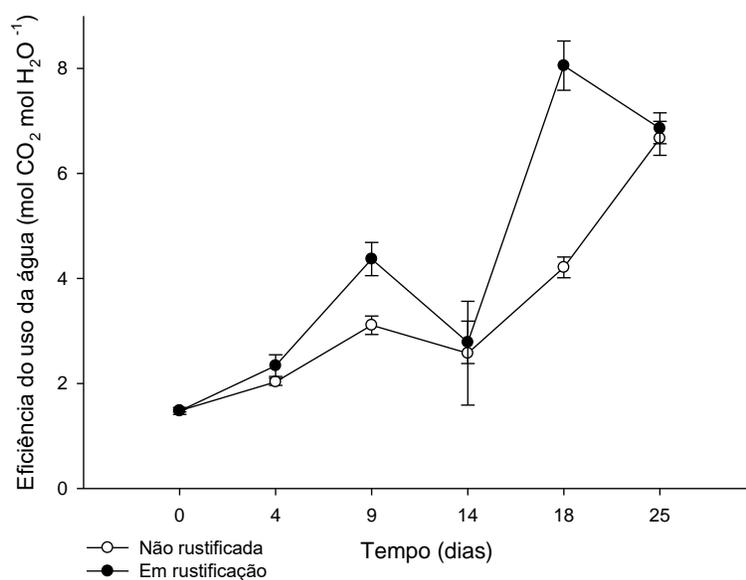


Fig. 4: Eficiência instantânea no uso da água para plantas não rustificadas e em rustificação (n=4)

O aumento na resistência estomática tende a aumentar mais a resistência de fluxo de H<sub>2</sub>O do que de CO<sub>2</sub>, o que acarreta em maior diminuição da transpiração do que de fotossíntese (GUO, ZHANG e HUANG, 2010). Ao analisar os dados de mudas não rustificadas (Tab. 1), é possível notar diminuição tanto na taxa de *A* quanto de *E*, com diminuição acentuada em *E* ao longo do

tempo. COSTA e SILVA et al, (2009) verificaram quedas significativas nas taxas de fotossíntese em mudas aclimatadas e não aclimatadas de *Eucalyptus globulus* quando em temperaturas entre 10 e -2 °C e atribuíram isso ao aumento de espécies reativas de oxigênio e injúrias nas membranas celulares. Pode-se notar que em alguns dias a *EUA* do grupo em rustificação obteve taxas semelhantes ao grupo não rustificado, esse padrão foi também observado em *Eucalyptus camaldulensis* quando em estresse hídrico (UTKHAO e YINGJAJAVAL, 2015).

Tabela 1 – Média das variáveis *A* ( $\mu\text{Mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), *gs* ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) *E* ( $\text{mol. H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e *EUA* ( $\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) em mudas não rustificadas (NR) e em rustificação (ER).

Dias	<i>A</i>		<i>gs</i>		<i>E</i>		<i>EUA</i>	
	ER	NR	ER	NR	ER	NR	ER	NR
0	17.5 Aa	18.4 Aa	0.268 Aa	0.26 Aa	12 Aa	12.4 Aa	1.46 Ac	1.48 Ad
4	11.2 Bb**	18.2 Aa	0.046 Ac	0.052Acd	5.1 Bb**	9.0 Ab	2.19 Ac	2.03 Acd
9	10.7 Ab	11.8 Ab	0.11 Ab**	0.041Bcd	2.5 Bcd**	3.9 Ac	4.28 Ab*	3.03 Bbc
14	8.2 Bc**	12.9 Ab	0.018 Bc**	0.069Abc	3.1 Bbc*	6.5 Ac	2.64 Ac	1.98 Acd
18	5.2 Bd**	11.0 Ab	0.012 Bc**	0.1 Ab	0.7 Bd	2.6 Ade	7.42 Aa**	4.23 Bb
25	6.2 Bd**	10.2 Ab	0.009 Ac	0.017 Ad	1.0 Ad	1.5 Ae	6.2 Aa	6.8 Aa
Fc		4.350		4.093		4.019		4.375
DMS		0.95		0.137		0.766		0.497
CV		13.81		30.88		23.16		20.01

Letras maiúsculas representam diferenças significativas nos diferentes tratamentos em mesmo tempo (linhas) e letras minúsculas representam diferenças significativas em um só tratamento sob diferentes tempos (coluna) analisados pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

\* simboliza  $P < 0,01$  e \*\*  $P < 0,001$  entre os diferentes tratamentos no mesmo dia.

As mudas não rustificadas aumentaram o conteúdo de clorofila total, por outro lado, as mudas que foram submetidas ao tratamento de rustificação não apresentaram o mesmo comportamento, resultando em níveis com pouca variação do início para o final da rustificação (fig. 5). Foi verificada diferenças significativa ( $p < 0,001$ ) entre os tratamentos e no mesmo tratamento como mostra a tabela 4 (anexo). A depleção nos níveis totais de clorofila está associada com o aumento da radiação (PAREEK et al., 2010). Essas variações evidenciam alterações entre

os níveis de clorofila e outros pigmentos e a influência desses na proteção do fotossistema contra a radiação solar (MORALES et al, 1994; STOBER et al, 1992).

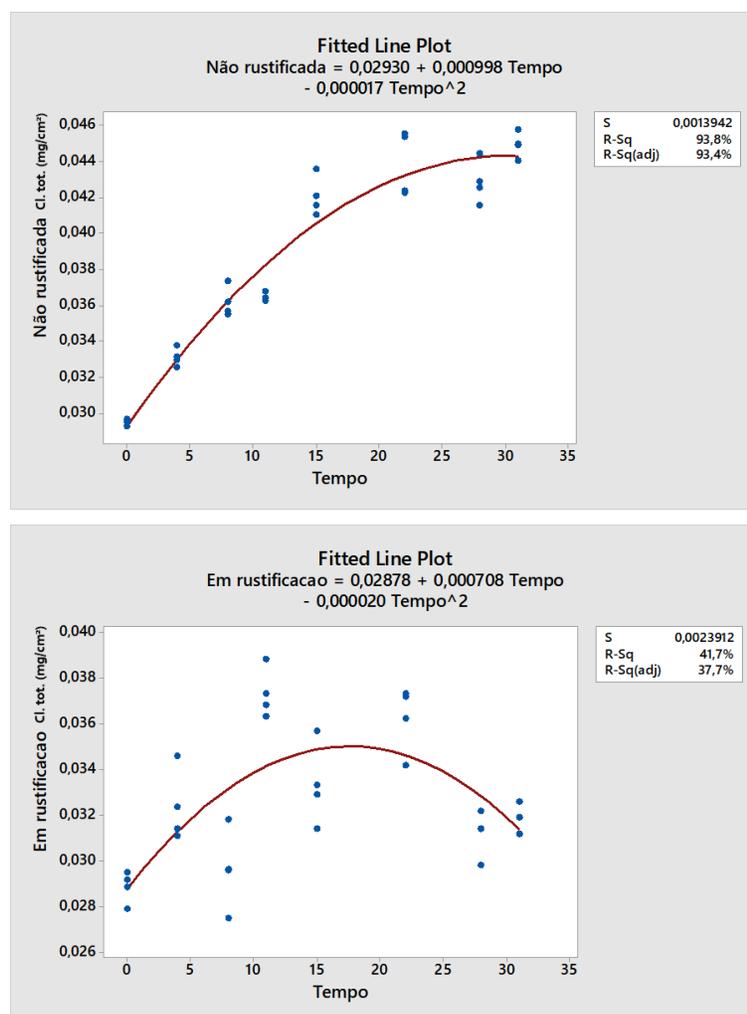


Figura 5: Regressão para clorofila total em função do tempo (dias) de rustificação.

De acordo com LI et al. (2015) e GUO et al. (2010), variações na quantidade de clorofila total podem estar associadas ao estresse imposto pela

aclimatação sendo fatores atribuídos a queda nas quantidades de pigmentos fotossintéticos: as baixas taxas biossintéticas e as altas taxas de degradação de paredes celulares além da redução da eficiência na carboxilação e da eficiência quântica.

Outro fator associado ao estresse causado pela aclimatação são as alterações na condutância estomática (*gs*). 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 conteúdo relativo de água ou os de potencial hídrico (FLEXAS e MEDRANO, 2002). Isso porque os estômatos desempenham um papel crítico na fisiologia das folhas, equilibrando a necessidade de captação de CO<sub>2</sub> fotossintética e o controle da perda de água pelas folhas (UTKHAO e YINGJAJAVAL, 2015). Verificou-se diferenças estatísticas na condutância estomática em mudas sob rustificação durante os dias 4 e 9 ( $P < 0,05$ ). Verificou-se entre os dias 0 e 4 redução em *gs* das mudas em ambos os tratamentos (mudas rustificadas e não rustificadas) com flutuações ao longo do experimento. Mudas não rustificadas diferiram entre si, sendo essas diferenças observadas nos dias 4, 14 e 25. Quando os tratamentos foram comparados pode-se observar que houveram diferenças estatística nos dias 9 e 18 ( $P < 0,05$ ) (fig. 6).

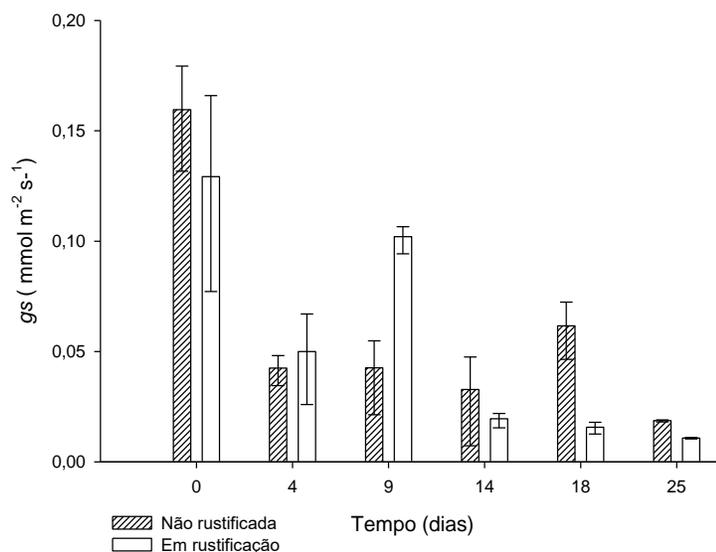


Figura 6: Condutância estomática em mudas não rustificadas e em rustificação.

Barras indicam o erro padrão (n=4).

Foi observado por Merchant et al. (2007), ao analisarem seis espécies de eucalipto que as taxas de condutância estomática juntamente com as de fotossíntese reduziram quando em estresse sendo que a taxa de condutância estomática teve redução mais acentuada que a de fotossíntese. Esse padrão também foi observado por Utkhao e Yingjajaval (2015), com *Eucalyptus camaldulensis*. Essas características observadas na rustificação sugerem otimização no processo fisiológico de homeostase além de evidenciar a degradação de clorofila total nas mudas em rustificação. Com o aumento de exposição dos centros reativos dos fotossistemas I e II à radiação solar, as plantas induzem a produção de carotenóides que possuem funções de proteção a esses centros (BRASLAVSKY e HOLZWARTH, 2012).

A taxa de fotossíntese variou para mudas em rustificação de forma significativa ( $P < 0,01$ ) nos dias 4, 14 e 18 sendo que em mudas não rustificadas a variação ocorreu do dia 4 para o 9. Ao comparar mudas rustificadas com não rustificadas nota-se diferenças entre os dias 4, 14, 18 e 25. É possível verificar que ambos os tratamentos apresentaram queda na taxa de fotossíntese (fig.7). Porém a partir do nono dia a fotossíntese das mudas não rustificadas permanece praticamente constante, enquanto que a das mudas em rustificação apresentaram redução. As mudas em rustificação apresentaram queda na taxa de fotossíntese que continuou a cair até o décimo oitavo dia na qual permaneceu com níveis menores que  $10 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

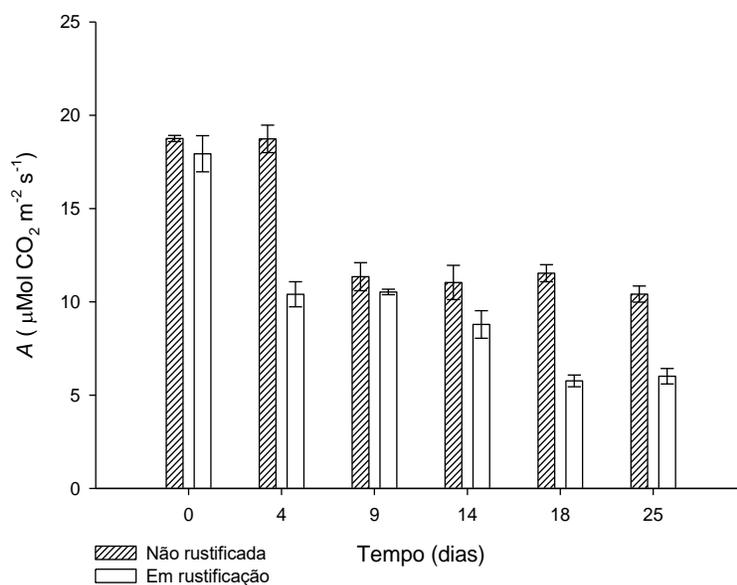


Figura 7: Taxa de fotossíntese líquida em mudas não rustificadas e em rustificação, barras sinalizam erro padrão (n=4)

Vários são os fatores que podem afetar a taxa de fotossíntese, entre eles estão: temperatura foliar, concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, energia de ativação da taxa máxima de RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato), carboxilação e a energia de ativação da taxa de regeneração da RuBisCO (HIKOSAKA et al., 2006).

É possível analisar a partir da interação entre  $A$ ,  $\psi_w$  e carbono intercelular ( $C_i$ ), que a queda no  $\psi_w$  influencia diretamente na queda das taxas de  $A$  e de  $C_i$  do clone em rustificação (fig. 8). Sabe-se que os níveis de  $C_i$  podem variar de acordo com a taxa de respiração, fotossíntese, condutância estomática e [CO<sub>2</sub>] atmosférico (LAWSON et al., 2014). A redução no potencial hídrico foliar afeta a queda da condutância estomática em diferentes espécies de eucalipto sob situações de estresse (MERCHANT et al., 2007). Esse padrão também foi observado neste trabalho em mudas durante a rustificação, uma vez que essa prática constitui em condição de estresse controlado. Todavia, os valores não foram reduzidos tão drasticamente como nos observados em outros trabalhos com mudas, quando utilizados estresses mais severos (UTKHAO e YINGJAJAVAL, 2015).

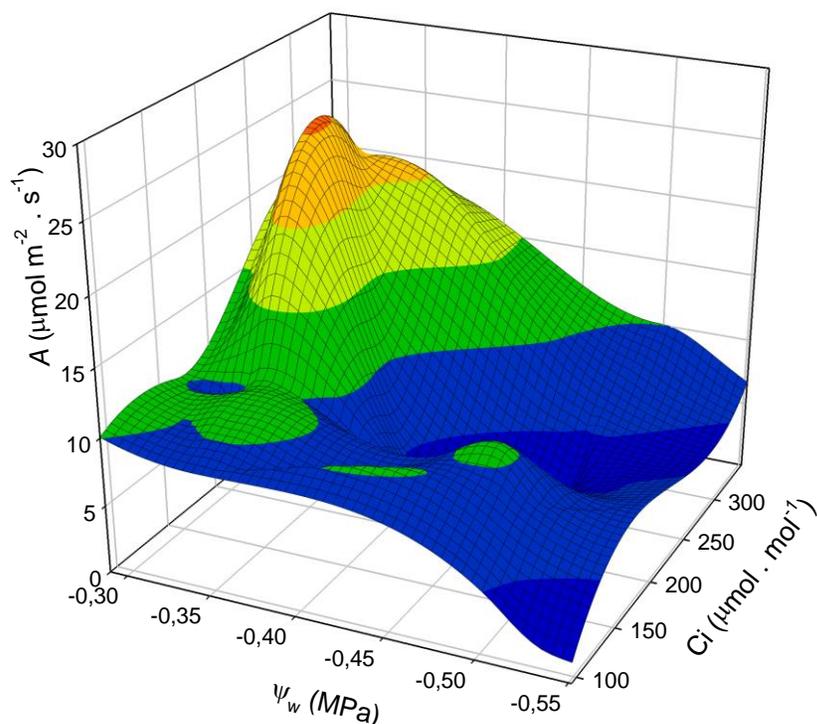


Figura 8: Relação entre taxa de fotossíntese líquida (A), carbono intercelular (Ci) e média entre os potenciais hídrico ( $\Psi_w$ ) nas mudas em rustificação.

Outros fatores também influenciam na variação da taxa de fotossíntese, como por exemplo, a temperatura e a cinética da RuBisCO. A temperatura ótima aumenta a medida que aumenta a taxa de Ci. Em baixas concentrações da molécula de CO<sub>2</sub> a velocidade de carboxilação é menos sensível a alterações ambientais, e as taxas de fotorespiração podem diminuir (HIKOSAKA et al., 2006; BROOKS e FARQUHAR, 1985). Quando analisados isoladamente, observa-se variações significativas ( $p < 0,01$ ) nas médias dos tratamentos,

apresentando tendência à queda para todas as variáveis observadas, com exceção da eficiência no uso da água. Para esta variável, ambos os tratamentos apresentaram aumento quando comparado a taxa do primeiro dia com a do último dia de avaliação.

Ao analisar anatomicamente os cortes dos caules foi possível observar que mudas de eucalipto não rustificadas mantiveram uma baixa concentração de amido ao longo do tempo (fig. 9). Já para mudas em processo de rustificação houve aumento na deposição de amido (fig. 10). Moléculas ricas em energia são usadas, dentre outros fins, para a divisão celular e para a diferenciação do xilema. A partir da diferenciação do xilema, o consumo de amido presente tanto no xilema quanto no floema é diminuído significativamente (Begum et al., 2010). Assim sendo, é possível deduzir que a presença dessas moléculas é esperada para o desenvolvimento de estruturas caulinares no crescimento primário e secundário.

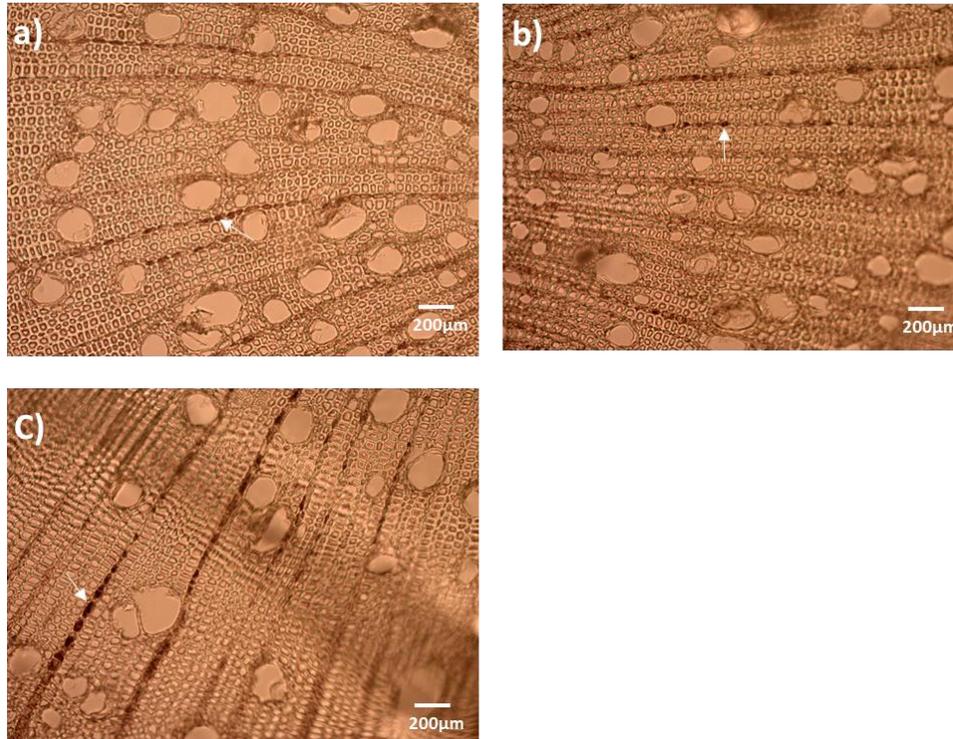


Figura 9: Secção caulinar transversal de mudas não rustificadas do híbrido urograndis nos dias 0 (a), 15 (b) e 30 (c) do experimento. Setas representam célula corada com amido.

A disponibilidade desse polissacarídeo pode estar relacionada com processos regulatórios caulinares que determinam a quantidade de carbono disponível para o estoque, manutenção e dissociação do amido. Parte desse processo é regulado pelo metabolismo da triose fosfato (triose-P) exportado dos cloroplastos para a síntese de sacarose e amido (Stitt e Quick, 1989).

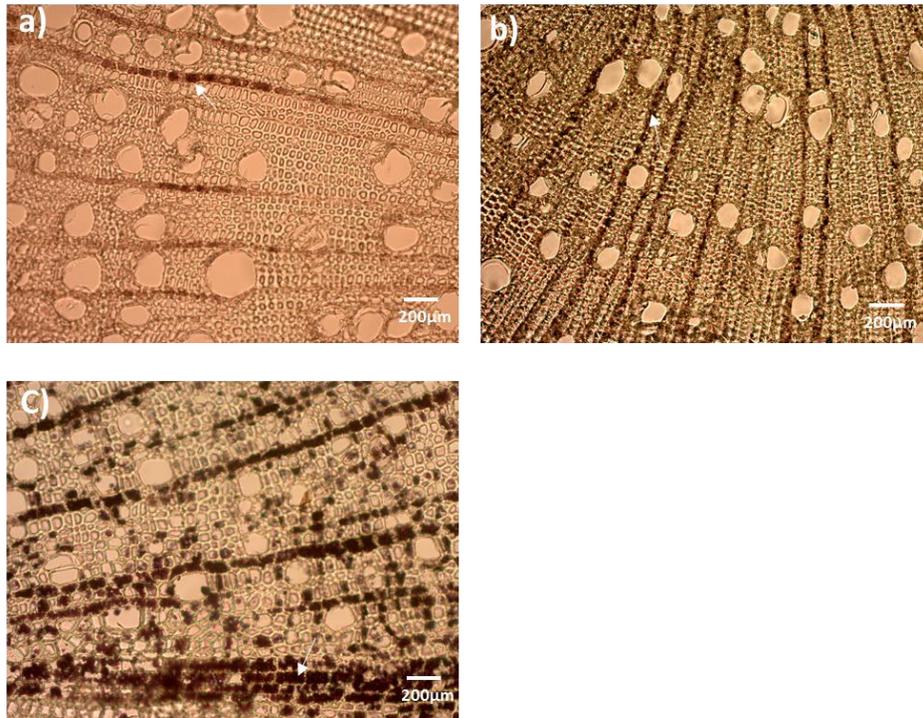


Figura 10: Secção caulinar transversal de mudas não rustificadas do híbrido urograndis nos dias 0 (a), 15 (b) e 30 (c) do experimento. Setas representam célula corada com amido.

Villar-Salvador et al. (2004) utilizaram diferentes regimes hídricos na rustificação em carvalho (*Quercus ilex*) e notaram variação nos níveis de açúcares e carboidratos. Verificaram que a rustificação diminui a quantidade de açúcar em brotações, ao passo que aumenta a quantidade de amido no mesmo local. A diminuição do amido foi também notificada por esses autores quando houve aumento na restrição da água durante o processo de rustificação. Sabe-se que proteínas envolvidas em vias metabólicas relacionados com a síntese de amido (GBSS/glicogênio) estão relacionadas a proteção estrutural em resposta ao

estresse hídrico e podem ser mais expressas em linhagens tolerantes a esse estresse (VALDÉS et al., 2013). Em estresse ambiental o amido pode ser despolimerizado em açúcares simples que serão utilizados para reparar danos, como por exemplo em vasos embolizados (NARDINI, LO GULLO e SALLEO, 2011). O'Brien et al. (2014), atribuíram o prolongamento da vida de espécies arbóreas tropicais acondicionadas em ambientes de sombra e luz sob estresse hídrico a diferentes níveis de reservatório de carboidrato. Foi possível verificar que a sobrevivência era mais prolongada quanto maior o reservatório. Resultados semelhantes também foram observados por Woodruff et al. (2015) ao compararem *Pinus edulis* e *Juniperus monosperma*, sob déficit hídrico, com diferentes níveis iniciais de amido.

O padrão de distribuição de células coradas com lugol no floema e no parênquima radial externo ao xilema sugere acúmulo de amido e evidência a disponibilidade desse durante o período de aclimação. Dessa forma, pode-se notar que o processo de rustificação, por também aumentar o reservatório de amido, tem esse fator como possível mecanismo de sobrevivência para as mudas rustificadas quando em estresse hídrico. A partir das observações feitas em diferentes tempos e a progressão observada, é possível inferir sobre a importância do amido para a rustificação, todavia, estudos direcionados para análises metabólicas e ultra estruturais são sugeridos.

Outras moléculas de grande importância para o desenvolvimento da planta e o controle do estresse são as enzimas antioxidante (GILL e TUTEJA, 2010). Durante a rustificação verificou-se aumento da atividade das enzimas antioxidantes de mudas em rustificação. Dessa forma, acredita-se que essas enzimas atuaram na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sabe-se que a medida que o potencial hídrico cai pode ocorrer aumento da atividade de

enzimas antioxidantes e essa diferença foi amenizada uma vez que a coleta ocorreu sempre no mesmo horário (10 horas) para ambos os tratamentos.

Plantas submetidas à rustificação tiveram níveis de atividade da enzima SOD maior que em mudas não rustificadas (aproximadamente 2,5 vezes) (figura 11). Padrão semelhante foi observado por Costa e Silva et al. (2009), ao compararem mudas aclimatadas e não aclimatadas ao estresse térmico (frio) em *Eucalyptus globulus*.

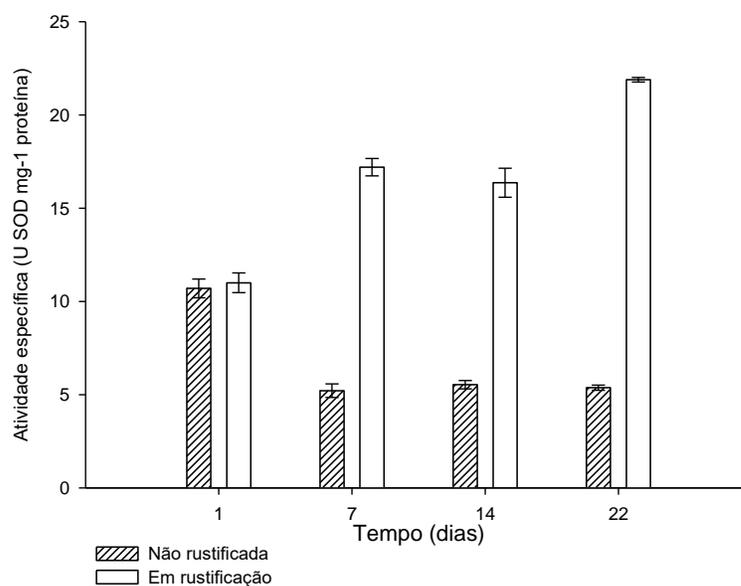


Figura 11: Atividade específica da SOD em mudas de eucalipto não rustificadas e mudas em rustificação ao longo de 22 dias, barras indicam o erro padrão da média (n=4).

Quando comparados, mudas não rustificadas e em rustificação verifica-se comportamentos distintos quanto a atividade da enzima SOD. Mudas não rustificadas apresentaram, em geral, manutenção da atividade enzimática em níveis menores do que os observados em mudas em rustificação. Dessa forma, o

processo de rustificação ativa os mecanismos de defesa e manutenção da integridade celular.

Analisando-se apenas mudas não rustificadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), ao longo do tempo, pode-se perceber a diminuição da atividade do primeiro para os outros dias, esse fator pode estar associado a mudança de ambiente, no qual as mudas que estavam sob o regime da empresa Esteio passaram ao serem transferidas de São Joao Del Rei para o Viveiro Florestal na UFLA.

As alterações na atividade enzimática observadas entre mudas rustificadas e não rustificadas mostram a importância da SOD em condições de estresse, podendo atuar como marcador bioquímico para plantas em estresse hídrico, devendo se levar em consideração as possíveis oscilações da atividade enzimática em condições normais, como sugerido por Leonardo, (2003), Zhujun et al. (2004), Rosa et al. (2005).

A atividade da enzima catalase também diferiu entre mudas não rustificada e em rustificação ( $p < 0,001$ ). Ao comparar os tratamentos pode-se verificar que não houveram diferenças significativas em função do tempo ( $p > 0,05$ ). Esse indicativo mostra baixa alteração dos níveis de atividade da catalase, ao longo do tempo, tendo essa enzima um papel sem padrões definidos no controle do estresse causado pela rustificação (fig. 12). Resultado semelhante foi obtido por Shvaleva et al. (2005) ao comparar diferentes clones de *Eucalyptus globulus* em estresse hídrico, nessa ocasião, foram analisados níveis de atividade de CAT em folhas e raízes e mesmo o estresse hídrico severo não foi suficiente para alterar significativamente os níveis dessa enzima nos tecidos analisados. Ao comparar as variações nos níveis de catalase para mudas em rustificação quanto ao grupo de mudas não rustificadas, pode-se observar que mudas em rustificação obtiveram diferença de até 3 vezes comparado com mudas não rustificadas, diferenciando significativamente ( $P < 0,01$ ) (tab. 2 do anexo).

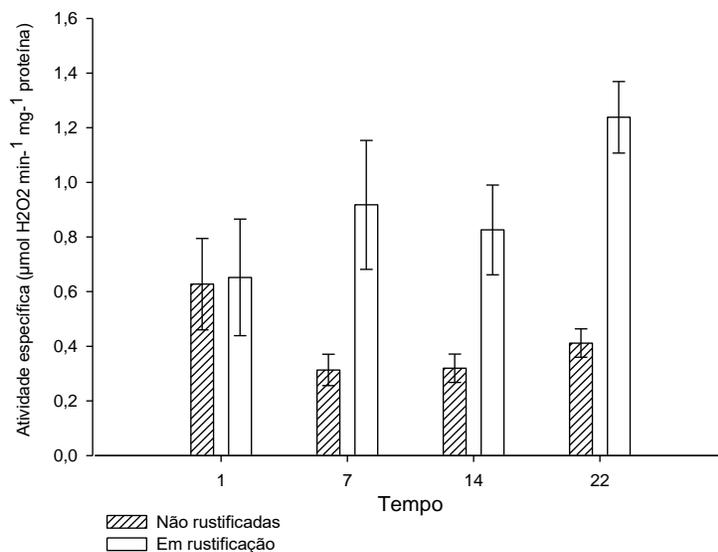


Figura 12: Atividade específica da CAT em mudas não rusticadas e mudas em rustificação ao longo de 22 dias. Barras indicam o erro padrão da média (n=4).

Níveis baixos de atividade da catalase podem estar relacionados com a queda na expressão gênica, essa tendência pode ser observada na atividade de genes como CAT1 e cytCAT, em plantas sob estresse ambiental (TAKEMURA et al., 2002; JITHESH et al., 2006). Baixas alterações na atividade dessa enzima podem também estar associadas com a alta eficiência dela em dissociar a molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois sabe-se que uma única molécula de CAT é capaz de converter 6 milhões de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> por minuto (GILL e TUTEJA, 2010).

A atividade da enzima MDHAR também apresentou diferença significativa entre os tratamentos (p<0,001). A atividade relativa dessa enzima foi maior em mudas rusticadas em comparação com mudas não rusticadas (fig.13). Alguns estudos mostram elevações na atividade de MDHAR em plantas

submetidas ao estresse (TAYEFI-NASRABAD et al., 2011; MAHESHWARI e DUBEY, 2009; HAN, LIU e YANG, 2009). Além disso, alguns genes podem estar associados à tolerância a estresses ambientais por serem responsáveis pelo aumento na taxa de MDHAR, como exemplo tem-se o LeMDAR presente no tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) (Feng et al. 2010).

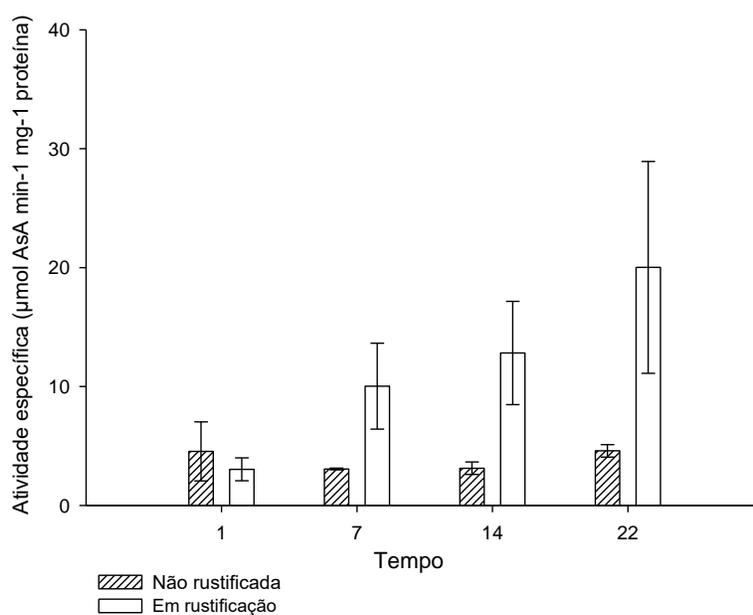


Figura 13: Atividade específica da MDHAR em mudas não rustificadas e mudas em rustificação ao longo de 22 dias. Barras indicam o erro padrão da média (n=4).

A medida que o potencial hídrico diminui observa-se o aumento da atividade enzimática. O baixo potencial hídrico foliar aliado a diminuição nas taxas de condutância estomática (fig. 7) e transpiração (Tab.1) podem acarretar em superaquecimento das estruturas devido a baixa regulação nas variações de temperatura, podendo ocasionar danos no PSII e em membranas celulares. Pode-

se notar que com a queda do potencial hídrico (fig. 3) os níveis de atividade enzimática tornam-se mais elevados.

O estresse causado por fatores ambientais, em plantas sob aclimação, pode ser responsável pelo aumento de injúrias causadas em membranas celulares. Sabe-se que a preservação da estrutura físico-química das membranas está associada à elevação da atividade de enzimas antioxidantes (Costa e Silva et al., 2009). Uma das evidências da efetividade da aclimação é a capacidade da planta em perceber os estímulos ambientais e modificar a taxa de crescimento de órgãos específicos.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se que mudas rustificadas apresentam ajustes fisiológicos (trocas gasosas), moleculares (atividade enzimática) e deposição de amido no caule durante a rustificação, as quais podem melhorar a resposta das mudas após o plantio.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Rockville, v. 116, p. 651-658, 1998.

BITENCOURT; et al. Frequency, Duration, Spatial Coverage, and Intensity of Heat Waves in Brazil. **Rev. bras. Meteorol**, São Paulo, v. 31, p. 4- 17, 2016.

BRASLAVSKY S. E.; HOLZWARTH A. R. Role of Carotenoids in Photosystem II (PSII) Reaction Centers. **Int J Thermophys**, Savirtibai, 33:2021–2025, 2012.

BRENNAN L, BLANCO FERNÁNDEZ A, MOSTAERT AS, OWENDE P. Enhancement of BODIPY505/515 lipid fluorescence method for applications in biofuel-directed microalgae production. **Microbiol Methods**, Madrid, v. 90, p.137-143, 2012.

BROOKS A.; FARGUHAR G. D. Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of RUBISCO and the rate of respiration in the light. **Planta**, Rockville, v. 165, p. 397-406, 1985.

CAKMAK I. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. **J. P. Nutrition and Soil Science**, Colombo, v. 168, p. 521–530, 2005.

COOPMAN, R. E.; et al. Changes in morpho-physiological attributes of *Eucalyptus globulus* plants in response to different drought hardening treatments. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 11, p. 1-10, 2008.

COSTA E SILVA, F. et al. Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. **Tree Physiology**, Tapada da ajuda, v. 29, p. 77–86, 2009.

COSTA e SILVA, F.; et al. Responses to water stress in two *Eucalyptus globulus* clones differing in drought tolerance. **Tree Physiol.**, Tapada da ajuda, v. 24, 1165-1172, 2004.

COCHRANE T. T.; COCHRANE T. A. Differences in the way potassium chloride and sucrose solutions effect osmotic potential of significance to stomata

aperture modulation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Tauranga, v. 47, p. 205-209, 2009.

DRANSKI, J.; et al. Effect of ethephon on hardening of *Pachystroma longifolium*. **Árvore**, Paraná, v. 37, p. 401-407, 2013.

FLEXAS J.; MEDRANO H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Ann Bot**, London, v. 89, p.183-189.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, Nova Delhi, 2010.

GOMES; et al. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. **Braz. J. Plant Physiol**, Piracicaba, v. 16, p.155-161, 2004.

GÓMEZ-RUIZ P.; LINDIG-CISNEROS R.; BARRERA E., MARTORELL C.; Potassium enhances frost tolerance in young individuals of three tropical dry forest species from Mexico. **Functional Plant Biology**, Cidade do México, v. 43, p. 461–467, 2016.

GUO, Y.; ZHANG, S.; HUANG, Y. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. **Journal of Plant Ecology**, Beijing, v. 3, p. 79–87, 2010.

HAN C.; LIU Q.; YANG Y.; Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. **Plant Growth Regulation**, Kyoto vol. 58, pp. 153–162, 2009.

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

HIKOSAKA K.; et al. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. **J Exp Bot**, Tokyo v. 57, p. 291-302, 2006.

HOSSAIN M.; NAKANO Y.; ASADA K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiol**, Kyoto 1984;25:385–395.

HUANG, X.; LIU, Y.; LI, J. The response of mulberry trees after seedling hardening to summer drought in the hydro-fluctuation belt of Three Gorges Reservoir Areas, **Envi Sci Pollut Res**, Chongqing, v.29, p. 7103–7111, 2013.

IBÁ. **Relatório Anual**. Indústria Brasileira de Árvores, p. 100, 2016.

IMSANDE, J.; RALSTON, E. J. Hydroponic growth and the nondestructive assay for dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 1380- 1384, 1981.

JITHESH M.; et al. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. **J Genet**, Cordoba, v. 85, p. 237–254, 2006.

JESUS, C.; Salicylic acid and drought tolerance improvement in *Eucalyptus*. 2014. p. 62. Dissertação (mestrado em engenharia florestal). Universidade de Aveiro, Portugal, 2014.

LAWSON T, SIMKIN AJ, KELLY G, GRANOT D. Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. **New Phytol**, Bet-Dagan, v. 203, p. 1064-1081, 2014.

LEONARDO, M. **Estresse salino induzido em plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e seus efeitos sobre a produtividade e parâmetros agronômicos e bioquímicos**. 2003. p. 100. Dissertação (mestrado em agronomia). UNESP/FCA, Botucatu, 2003.

LI C.; TAN D.; LIANG D.; CHANG C.; JIA D.; MA F. Melatonin mediates the regulation of ABA metabolism, free-radical scavenging, and stomatal behaviour in two *Malus* species under drought stress. **J Exp Bot**. Beijing, v. 27, p. 669–80, 2015.

MAHESHWARI; DUBEY R. S., Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Nova Delhi v. 59, p. 37–49, 2009.

NARDINI A.; LO GULLO M.A.; SALLEO S. Refilling embolised xylem conduits: is it a matter of phloem unloading? **New Phytologist**, Triest, 138, 327–342, 2011.

NOVICHONOK; et al. Use of the atLEAF+ chlorophyll meter for a nondestructive estimate of chlorophyll content. **PHOTOSYNTHETICA**, San Diego, v. 54, p. 130-137, 2016.

ROCHA J H T, et al. Produtividade do minijardim e qualidade de miniestacas de um clone híbrido de eucalyptus grandis x eucalyptus urophylla (i-224) em função de doses de nitrogênio. **Ciência Florestal**, Sinop, v. 25, p. 273-279, 2015.

ROSA S.; VON PINHO E.; VIEIRA D.; VEIGA D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas lea associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Rev Bras Sementes**, Piracicaba, v. 27, p. 91-101, 2005.

SHAO, H. B. et al. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants *Comptes Rendus*. **Biologies**, Binzhou, v. 37, p. 215-225, 2008.

SHEN J. **Characterization of drought stress regulator CBF / DREB genes in Hordeum vulgare: Expression analysis in ten different barley cultivars**. 2013. p. 142. Dissertação (Mestrado em genética). Universidade de Bonn. Qingdao, 2013.

SHVALEVA L.; et al. Metabolic responses to water deficit in two Eucalyptus globulus clones with contrasting drought sensitivity. **Tree physiology**, Madrid v. 26, p. 239–248, 2006.

STITT e QUICK. Photosynthetic carbon partitioning: its regulation and possibilities for manipulation. **Physiologia Plantarum**, v. 77: 633–641. 1989.

TAKEMURA T, et al. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. **Aquat Bot**, Kyoto, v. 68, p.15-28, 2000.

TAYEFI-NASRABADI, et al. Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* cv.). **African Journal of Biotechnology**, Congo, v. 10, p. 751–763, 2011.

TEIXEIRA F. **Influência Da Rustificação No Comportamento Fisiológico De Mudanças De *Eucalyptus Urograndis* Submetidas Ao Déficit Hídrico**. 2012. p. 92. Dissertação (Mestrado em engenharia florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

VALDÉS E.; et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of proteomics**, Asturias, v. 79, p. 263–76, 2013.

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**, v. 29, p. 1581–1592, 2015.

VILLAR-SALVADOR, P.; et. al. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. **Tree Physiology**, Madrid, 24, 1147–1155, 2004

XOCONOSTLE-CÁZARES, et al. Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, Zacatenco, v. 5, p. 1–16, 2010.

WANG M.; ZHENG Q.; SHEN Q.; GUO S. The critical role of potassium in plant stress response. **Int. J. of Mol. Sci.**, Tehran, v. 14, p. 7370–7390, 2013.

WILLIAMS L.; ARAUJO J. Correlations among predawn leaf, midday leaf and midday stem water potential and their correlation with other measures of soil and plant water status in *Vitis vinifera*. **J. Amer. Soc. Hort**, Virginia, v.123, p.448-456, 2002.

WOODRUFF, D.; et al. Linking nonstructural carbohydrate dynamics to gas exchange and leaf hydraulic behavior in *Pinus edulis* and *Juniperus monosperma*. **New Phytologist**, Bordeaux, v. 206, p. 411-421, 2015.

ZHUJUN, Z.; et. al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Sci.**, Hangzhou, v. 167, p. 527-533, 2004

**CAPÍTULO 3: Respostas fisiológicas e moleculares de mudas rustificadas e não rustificadas do híbrido urograndis (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) submetidas ao déficit hídrico**

**RESUMO:**

Caracteriza-se como estresse, alterações fisiológicas normais causadas por fatores bióticos ou abióticos. Para as plantas, o estresse causado pela seca é um dos que apresenta maior risco para o seu desenvolvimento e manutenção da vida, afetando processos como fotossíntese, respiração, metabolismo de carboidratos, absorção de íons, entre outros. Alguns procedimentos adotados na produção de mudas florestais podem diminuir os impactos causados pelo déficit hídrico após o plantio. Um desses procedimentos é a rustificação que consiste no manejo das condições ambientais tais como a exposição a luz solar, o regime de irrigação e fertilização com o objetivo de condicionar as mudas para possíveis condições adversas após o plantio. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar respostas fisiológicas e moleculares de plantas rustificadas e não rustificadas submetidas ao déficit hídrico. Foram avaliadas a taxa de fotossíntese ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), carbono intercelular ( $C_i$ ), transpiração ( $E$ ) e eficiência no uso da água ( $EUA$ ) além do potencial hídrico foliar e atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e monodehidroascorbato redutase (MDHAR). A emissão de folhas e os sintomas de seca também foram estudados. Foi possível verificar que mudas rustificadas apresentam respostas fisiológicas que podem permitir às mudas suportar o estresse hídrico por um período maior quando comparado com as não rustificadas. Essas respostas foram o aumento do período para visualização de sinais de murcha, aumento do número de folhas, maior taxa de  $A$  e  $g_s$  além de maior potencial hídrico foliar. Em mudas rustificadas foi observado maior atividade das enzimas antioxidantes durante o período de estresse. Conclui-se que a rustificação traz benefícios fisiológicos e moleculares que podem aumentar a chance de sobrevivência, especialmente em caso da ocorrência de estresse hídrico severo por um período de até 14 dias.

Palavras-chave: Déficit hídrico, Rustificação, eucalipto urograndis

**ABSTRACT:**

Physiological changes caused by biotic or abiotic factors may be characterized as stress. Drought stress is the recognized as the most prevalent environmental factor limiting plant development and growth, affecting processes such as photosynthesis, respiration, carbohydrate metabolism, ion absorption, among others. Some procedures adopted in the production of forestry seedlings may reduce the impacts caused by the water deficit after planting. One of these procedures is the seedling hardening which consist in management of environmental resources such as changes in the sunlight exposure, irrigation and fertilization in order to prepare seedlings to cope with possible environmental stresses after planting. Thus, this work had as objective evaluate physiological and molecular responses of hardened and non-hardened seedlings submitted to water deficit. It was evaluated the photosynthesis rates ( $A$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), intercellular carbon ( $C_i$ ), transpiration ( $E$ ) water use efficiency ( $EUA$ ), leaf water potential and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR). Number of new leaves and drought symptoms were also investigated. It was possible to notice that hardened seedlings present physiological responses that may allow then to survive for a longer period under drought stress when compared to non-hardened ones. These responses were the increase in the number of new leaves, postponement of the period for observation of wilting symptoms, higher  $A$ ,  $g_s$  and leaf water potential. It was also observed in hardened seedlings higher activity of the antioxidant enzymes during the period of stress. As a conclusion, hardening brings physiological and molecular benefits to seedlings that may increase the chance of survival, especially in case of severe water stress for up to 14 days.

Key words: Water deficit, Hardening, eucalypt urograndis

## 1 INTRODUÇÃO

Avanços tecnológicos nas áreas de manejo, logística e produção de madeira tem contribuído para o aperfeiçoamento do setor brasileiro de florestas. Com área plantada de aproximadamente 7,8 milhões de hectares, esse setor tem contribuído não somente para o crescimento econômico do país, mas também para questão ambiental (IBÁ, 2016).

Uma grande preocupação dos produtores são os diversos tipos de estresse que as plantas podem vir a sofrer após o plantio. A condição de estresse ambiental é comum na natureza e, portanto, as plantas desenvolveram diversos mecanismos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos ao longo das gerações (ARNDT et al., 2001). Apesar disso, o prolongamento e a intensidade do estresse podem afetar fortemente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (ZLATEV e LIDON, 2012). Em se tratando de estresse hídrico os danos nas plantações podem ser severos devido ao papel da água para a nutrição das plantas e manutenção da atividade metabólica celular. Nesse sentido, tanto a disponibilidade, quanto a qualidade da água pode ser um fator limitante para o crescimento das plantas (MENCUCCINI, 2014).

Adaptações às respostas das plantas podem envolver mudanças na expressão de genes que codificam proteínas que contribuem para o aumento da tolerância à seca. Essas podem ser enzimas envolvidas na remoção e inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são danosas a membranas celulares, ácidos nucleicos e aminoácidos, sendo encontradas em maior quantidade quando a planta está estressada (BLOKHINA e FAGERSTEDT, 2010). Uma característica notável na adaptação das plantas ao estresse abiótico é a ativação de respostas múltiplas envolvendo interações gênicas complexas que interagem entre si e com diversas vias moleculares (GRANDA et al. 2014). Essas modificações resultam em grandes alterações em componentes químicos das plantas, sendo

evidenciadas por exemplo por alterações dos níveis de açúcares totais, betaínas, glicinabetainas, prolina, quercitol (SAKAMOTO e MURATA 2000; ARNDT et al., 2008; MORALES et al., 2013).

A tolerância ao estresse hídrico pode ser intensificada em mudas de eucalipto, em viveiros florestais e a técnica mais utilizada para esse propósito é a rustificação que consiste na aplicação gradativa de KCl simultaneamente à diminuição na quantidade de água para irrigação. Esses processos são direcionados conforme as condições climáticas do dia e também de acordo com a respostas das mudas no viveiro. Sendo assim, os fatores que regem o desenvolvimento e a sobrevivência das mudas estão diretamente atreladas às respostas ambientais e principalmente como as plantas respondem a eles (STAPE et al., 2001). Objetivou-se com esse trabalho analisar fisiológica e molecularmente plantas rustificadas e não rustificadas submetidas ao déficit hídrico no intuito de observar as respostas perante o estresse.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal, localização e solo**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação coberta com filme plástico transparente de 0,2 cm de espessura e laterais cobertas por sombrite 50% de inibição de raios solares, localizada no viveiro de mudas florestais da UFLA. Foi conduzido durante 14 dias (23/8 a 6/9 de 2016) no município de Lavras, localizado na região sul de Minas Gerais, a 918 metros de altitude, latitude 21° 14' S e longitude 45° 00' W.

Durante esse período a temperatura média foi de 20,5°C com mínima de 9,5°C no primeiro e máxima de 30,6°C no sétimo dia. A umidade relativa do ar teve média de 61%.

Foram usadas mudas do híbrido urograndis com aproximadamente 90 dias de idade, as quais foram plantadas em vasos de 4,5 L preenchidos com solo de textura média, peneirado em peneira de malha de 1cm. O mesmo foi analisado no Laboratório De Análises do Solo (UFLA) quanto a fertilidade e granulometria (tabela 2).

Tabela 2 – Resultados físico-químicos do solo de textura média utilizado no plantio das mudas, realizado pelo Laboratório De Análises do Solo, departamento de Ciências do Solo (DCS), UFLA.

pH	K	P	Na	Ca	Mg	Al	H+Al
	Mg/dm <sup>3</sup>			Cmol/dm <sup>3</sup>			
6,5	79,8	0,87	---	0,38	0,11	0,00	1,07

SB	T	T	V	m	M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
Cmol/dm <sup>3</sup>			%		Dag/Kg	Mg/L	Mg/dm <sup>3</sup>					
0,69	0,69	1,76	39,47	0,00	0,61	20,96	0,41	90,63	16,35	1,22	0,03	86,45

Classificação Do Solo	Argila	Silte	Areia	Areia (Grossa)	Areia (Fina)
	Dag/Kg				
Textura Média	24	5	71	---	---

## 2.2 Estresse hídrico

A determinação da capacidade de campo do solo foi realizada a partir da determinação de valores de tensão da água em volume conhecido de solo irrigado a 100% da capacidade de campo e também para o solo completamente seco (em estufa a 70°C por 72 horas). Os valores foram determinados com o uso de tensiômetro (DeltaLink) acoplado a sensores de umidade tipo ThetaProbes utilizando para tal o software DeltaLINK 3.2 (2015). Com base nos valores de tensão da água no solo e sabendo o volume de solo utilizado no vaso (4,5 cm<sup>3</sup>)

determinou-se o volume de água necessário para alcançar 60% de capacidade de campo em cada vaso.

Mudas não rustificadas e rustificadas, foram submetidas a duas condições. Na primeira condição manteve-se a irrigação durante o período do experimento (mantendo-se em 60% da capacidade de campo). Na segunda condição as mudas foram submetidas ao estresse hídrico, sob suspensão de rega após período de aclimação (6 dias). Em cada um dos quatro tratamentos (mudas rustificadas e não rustificadas sem estresse hídrico e mudas rustificadas e não rustificadas em estresse) foram utilizadas 90 mudas. Após o período de aclimação, dois tratamentos (mudas rustificadas e não rustificadas) foram submetidas ao regime de estresse hídrico com suspensão de rega até o final do experimento.

Os outros dois tratamentos de mudas rustificadas e não rustificadas sem estresse (controle) foram mantidas a 60% da capacidade de campo durante todo o experimento. A reposição de água nos vasos desses tratamentos foi realizado a cada 3 dias, no período da manhã (entre as 9 e 10 horas), utilizando-se o tensiômetro, acoplado ao sensor de umidade (Thetaprobe) para determinar o volume de água necessário em cada vaso. Os valores variam de 0 kPa (totalmente úmido) a -200 kPa (totalmente seco)

### **2.3 Análise de temperatura e umidade**

Temperatura e umidade dentro da casa de vegetação foram monitoradas, e as médias diárias para umidade relativa do ar, temperatura máxima e mínima foram determinadas durante todo o experimento (fig. 14). Para tal utilizou-se o aparelho termo higrômetro data logger Hikari HTU-21.kk. A umidade do ar variou de máxima de 64% no último dia e mínima de 30% no sétimo dia com temperatura

média de 20,3 °C e máxima de 30,6 °C no quinto dia e mínima de 9,5 °C no primeiro.

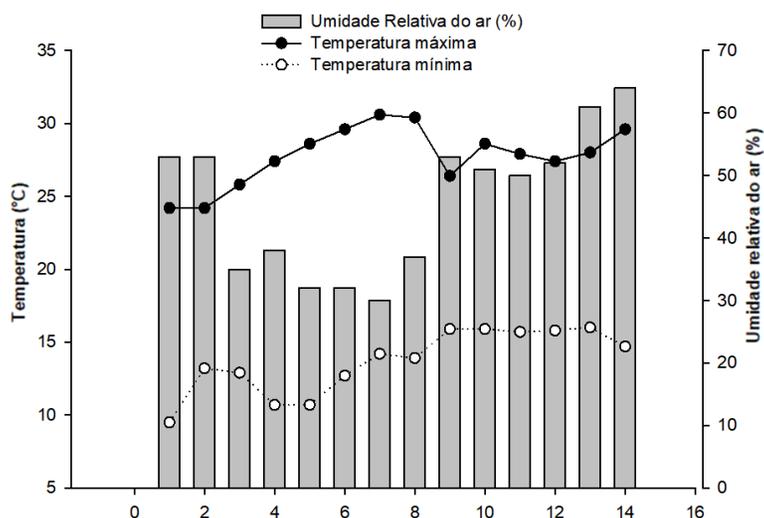


Figura 14: Dados climatológicos na casa de vegetação mensurados com termo higrômetro entre os dias 23/08 a 06/09/2016. Barras indicam umidade relativa do ar e linhas temperaturas máxima (preto) e mínima (branco).

## 2.4 Análises fisiológicas

As avaliações ecofisiológicas foram realizadas com um analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis System, LI-COR, Lincoln, USA) em folhas completamente expandidas (no 2º par de folhas). Para tal foi utilizada uma fonte artificial de radiação foto sinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em 600  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA) (JESUS, 2014; TEIXEIRA, 2012). As mensurações com IRGA foram realizadas de 4 em 4 dias, sendo utilizadas em

cada avaliação 4 mudas de cada tratamento. Foram avaliados: taxa fotossintética foliar ( $A$ ), condutância estomática ( $gs$ ), concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), transpiração ( $E$ ) e a partir da relação  $A/E$  foi mensurado a eficiência instantânea do uso da água (EUA). Para essa análise foi utilizada a mesma folha a qual foi marcada com barbante ao longo de todo o experimento.

### **2.5 Determinação do Potencial hídrico foliar**

O potencial hídrico foliar máximo e mínimo ( $\Psi_w$ ) foi medido utilizando quatro indivíduos de cada tratamento, escolhidos aleatoriamente nos dias 0, 2, 4, 8 e 12 dentro dos horários, 5 e 12 horas respectivamente, a partir da extração de 2 folhas totalmente expandidas do segundo par, tirando a média dos valores. Para tal mensuração foi utilizado o aparelho câmara de Scholander, portátil marca Soilmoisture modelo SEC-3115-P40G4V.

### **2.6 Atividade de enzimas do sistema antioxidante**

Nessa análise, foram coletadas todas as folhas completamente expandidas de 4 mudas de cada tratamento, nos dias 0, 4, 8 e 12. No momento da coleta, as folhas das 4 plantas foram colocadas em um tubo plástico tipo *Falcon* (50 ml) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento as folhas foram previamente trituradas, dentro do tubo, com auxílio de espátula esterilizada para a homogeneização das mesmas. O “pool” de amostras foi então armazenado em freezer a  $-80^\circ C$  até o momento da extração proteica.

A extração foi realizada de acordo como protocolo de Biemelt et al. (1998), sendo utilizado 0,2 g do pool de amostras que foi então macerado em nitrogênio líquido utilizando cadinho e pistilo. Após a maceração foi adicionado

1,5 ml de tampão de extração fosfato de potássio (0,1 M, pH7,8), EDTA (0,1 mM, pH 7,0), ácido ascórbico (0,01 M) e 22 mg de PVPP. A amostra foi então centrifugada a 15.000g durante 15 minutos e o sobrenadante coletado e mantido a -80°C até a utilização para quantificação da atividade enzimática. Para todas as análises foi utilizado o espectrofotômetro Epoch microplate, modelo Biotek. Foram realizadas 3 repetições biológicas (pool de quatro plantas) e 3 repetições técnicas usando amostras diluídas na razão de 1:50.

### **2.6.1 Dismutase do superóxido (SOD)**

A análise da atividade da enzima SOD, foi realizada conforme o protocolo de Giannopolitis e Ries, (1977) e está baseada na capacidade dessa enzima em inibir a fotorredução do reagente azul de nitrotetrazolito (NBT). Dessa maneira, 3 µl da amostra extraída e diluída (1:50) foi adicionado ao meio de incubação ( NBT 75 µM, EDTA 0,1 µM, metionina 14mM, fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) e riboflavina 2 µM) em poços individualizados em placa para espectrofotômetro de plástico com fundo redondo. Em seguida as reações foram iluminadas por uma lâmpada fluorescente 20W durante 7 minutos e a leitura no espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 560 nm.

Para o cálculo da atividade específica de SOD primeiramente a média das triplicatas técnicas foi dividido por 0,5 devido ao fato de que 1 unidade de SOD reduzir em 50% de NBT, esse valor foi então calculado para a quantidade total de extrato (1,5 ml) e posteriormente calculado para massa fresca de 0,2 g de material. A quantidade de massa fresca foi então dividido pela concentração de proteínas obtido pelo teste de Bradford (Bradford, 1976), para obtenção da atividade específica dada em Unidade de SOD mg<sup>-1</sup> proteína

### **2.6.2 Catalase (CAT)**

Para análise da atividade da enzima catalase (CAT), seguiu-se o protocolo de Havir e McHale (1987), no qual 9  $\mu$ l da amostra reagiu com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) aquecido em banho-maria a 30°C, 2 segundos antes da leitura, foi adicionado peróxido de hidrogênio 12,5 mM para o início da reação. Seguiu-se a leitura das amostras (em triplicata) sendo realizada em placas Corning half área, essa foi realizada no comprimento de onda de 240nm com medições a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Para essa reação observou-se o consumo de peróxido de hidrogênio e o decréscimo na absorbância com o coeficiente de extinção molar de 36  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

### **2.6.3 Monodehidroascorbato (MDHAR)**

Para análise da atividade da enzima monodehidroascorbato (MDHAR), seguiu-se o protocolo de Hossain et al. (1984) no qual 20 $\mu$ l da amostra reagiu com o tampão (Tris Hcl 50mM, Ascorbato 2,5mM e água) sendo que o tampão foi pré aquecido a 30°C com adição de NADH 0,1mM logo antes da leitura, a qual foi realizada em placas Corning half area no comprimento de onda de 340nm, com leitura a cada 15 segundos, durante 3 minutos. Foi observado, ao longo do tempo a redução na absorbância pela formação de ascorbato. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 6.2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## **2.7 Análise de murcha e formação de folhas novas**

Para a análise foi realizada observação em todas as mudas em déficit hídrico, presentes no experimento (90 de cada tratamento), dos sintomas de

murcha durante todo o experimento. Foram avaliados a murcha aparente, caracterizada pelo tombamento do ápice caulinar na região do meristema apical; a murcha permanente, caracterizada pela seca do ápice caulinar (TEIXEIRA, 2012). Para a determinação da formação de folha novas foi realizada a contagem de 15 plantas por tratamento.

### **2.8 Delineamento experimental e condução do experimento**

O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo 2 tratamentos (mudas rustificadas e não rustificadas) x 2 condições (sob déficit hídrico e sem déficit hídrico) X Tempo. Os dados foram submetidos à análise das pressuposições (teste de normalidade, Shapiro-wilk) com uso do software Minitab (17.1), em seguida foram analisados por análise de variância (ANOVA). Quando verificadas diferenças significativas pelo teste F a 5% de significância foi aplicado o teste de média Tukey a 5% de significância utilizando o software SISVAR 5.6.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Observando-se as variáveis ponto de murcha aparente e permanente entre os tratamentos submetidos ao estresse, foi possível notar que em mudas rustificadas a porcentagem de plantas apresentando murcha (aparente e permanente) foi sempre menor (fig. 15). As mudas não rustificadas apresentaram o sintoma de murcha aparente no terceiro dia, ao passo que nas rustificadas só foi observado murcha aparente no sétimo dia.

Comportamento semelhante foi observado para o ponto de murcha permanente. Verificou-se 11% de mudas com murcha aparente no décimo dia em

mudas não rustificadas, enquanto que as mudas rustificadas apresentaram somente 1% no mesmo dia. Ao final dos 14 dias as mudas não rustificadas apresentaram todas as mudas em ponto de murcha, sendo 56% com murcha aparente e 44% em ponto de murcha permanente, enquanto que as mudas rustificadas apresentaram 62% de murcha, sendo 42% em murcha aparente e 20% em murcha permanente.

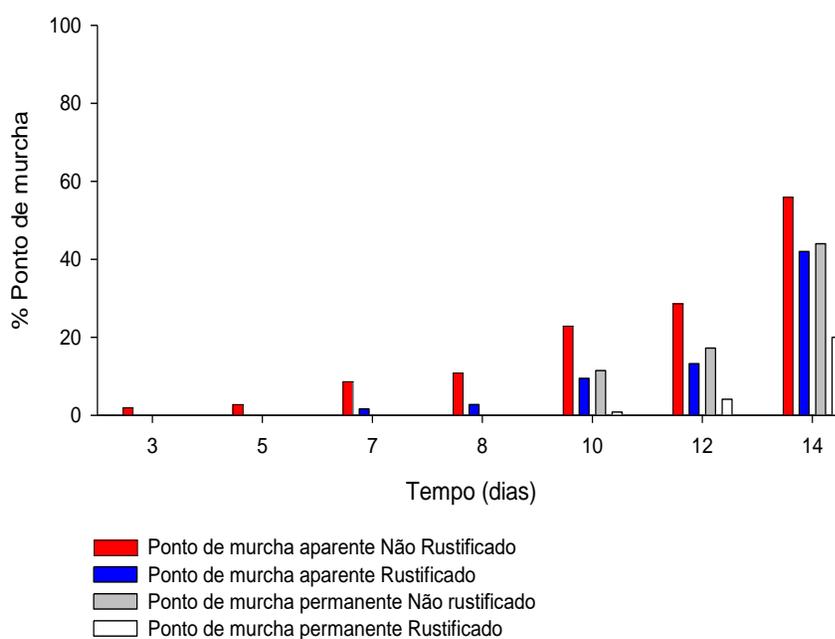


Figura 15: Porcentagem de mudas rustificadas e não rustificadas apresentando sintomas visuais de murcha aparente e permanente durante o período de déficit hídrico pela suspensão da irrigação.

Esse resultado apresentado pelas mudas rustificadas está associado com a capacidade das mudas rustificadas em lidar com a falta de água sendo que apresentam maior eficiência de absorção de água do substrato, já que em geral,

mudas rustificadas possuem sistema radicular mais desenvolvido, além de melhor controle osmótico (HUANG et al., 2013; COSTA E SILVA et al., 2009).

Com o aumento da intensidade do estresse hídrico há considerável perda de água na célula e como consequência, redução no volume de vacúolos, resultando na redução da turgescência celular, o que causa a murcha da folha e de estruturas adjacentes, podendo ocorrer também danos no aparato fotossintético, dessa forma pode ocorrer, primeiramente a murcha e posteriormente a morte dos tecidos (GUO et al., 2010; CHAVES, FLEXAS e PINHEIRO, 2009; NUNES, 2007).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a importância da prática de rustificação. Foi possível observar que em algumas das mudas não rustificadas apesar destas não apresentarem o ponto de murcha aparente na fase inicial do déficit hídrico, em alguns casos houve o aparecimento de outro sintoma de déficit hídrico, como a seca das bordas do limbo no ápice das folhas em formato de “V ” (figura 16). A partir do quinto dia foi possível distinguir ainda mais mudas rustificadas de não rustificadas devido à apresentação desse sintoma típico de seca, podendo estar acompanhado de murcha do ápice da planta. Mudas rustificadas também apresentaram esse sintoma, porém, esse só foi notado após a ocorrência de murcha aparente.

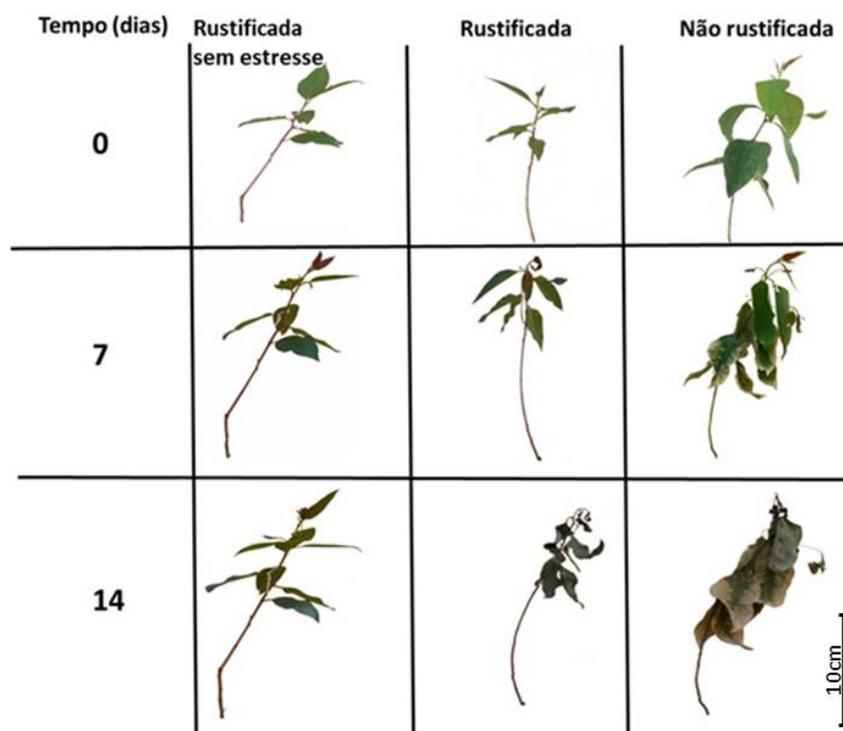


Figura 16: Evolução dos sintomas de murcha em mudas de urograndis em uma muda rustificada sem déficit hídrico (controle), rustificada e não rustificada durante o déficit hídrico.

As alterações sintomáticas observadas foram acompanhadas pela redução progressiva no  $\Psi_w$  das mudas. Em mudas não rustificadas a perda de água ocorreu de maneira mais acentuada e proporcionou, de forma prematura, maiores danos causados pelo estresse, quando comparado a mudas rustificadas. Mudas não rustificadas iniciaram o estresse hídrico com valores de  $\Psi_w$  médio de  $-0.2$  MPa, sendo mais alta que o restante dos tratamentos ( $-0.48$  MPa em mudas rustificadas sem déficit (controle) e  $-0.49$  MPa em mudas rustificadas). Comparando-se o potencial hídrico das mudas em estresse aos quatro e oito dias após o início do

déficit hídrico, pode-se observar que mudas rustificadas mantiveram melhor controle na perda de água mantendo os níveis de potencial hídrico acima das mudas não rustificadas. Nesse mesmo período, mudas não rustificadas tiveram uma redução maior do potencial hídrico, chegando a -2.48 MPa no último dia enquanto nas mudas rustificadas o potencial hídrico foi de -1.51 MPa no 14º dia (fig. 17). Mudanças rustificadas sem estresse mantiveram-se em níveis aceitáveis de mudas em condições normais de desenvolvimento (HUANG et al., 2013).

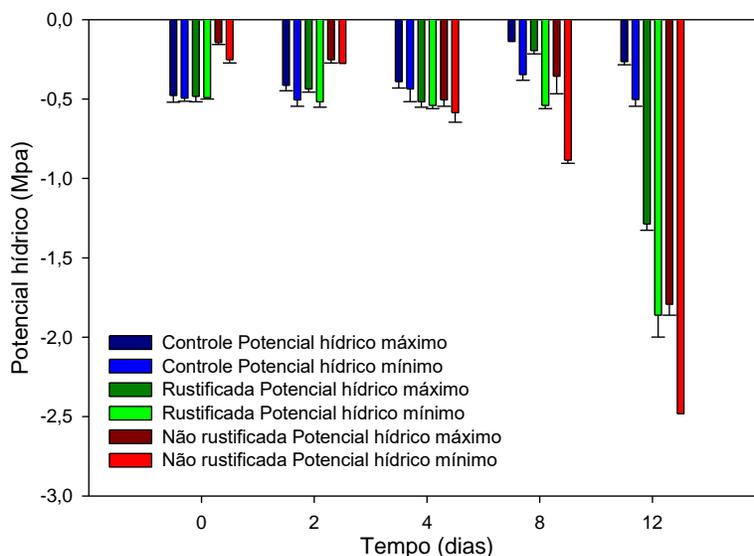


Figura 17: Potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) em mudas rustificadas sem estresse hídrico (controle); rustificadas e não rustificadas (com déficit hídrico). Barras representam o desvio padrão (n=4).

Além da observação de murcha durante o período de déficit hídrico, foi também analisado o desenvolvimento de novas folhas (Fig. 17). Foi possível verificar que plantas não rustificadas apresentaram abscisão foliar logo no início do experimento e não desenvolveram novas folhas até o fim do mesmo,

intensificando-a na fase final, na qual foi constatado maior abscisão entre os dias 12 e 14 (fig 18). Sabe-se que um dos mecanismos utilizados pelas plantas para reduzir a taxa de transpiração é a abscisão foliar, e essa estratégia pode ser usada em *Eucalyptus* sp. (Osorio et al., 1998).

O estresse hídrico pode influenciar no crescimento foliar em *Eucalyptus* sp., e a planta pode adotar diferentes estratégias no desenvolvimento foliar dependendo da intensidade do estresse (Myers e Landsberg, 1989). Dessa maneira, a planta utiliza da redução de estruturas fotossintetizantes para evitar danos ocasionados pela perda de água (GUO et al., 2010). A perda foliar pode ocorrer ao mesmo instante que há crescimento radicular, assim sendo, há ativação gênica e o consequente estímulo de síntese proteica além da ativação de rotas metabólicas para captação e preservação de água no intuito de obter melhor controle osmótico (HUANG et al., 2013; COSTA E SILVA et al., 2009).

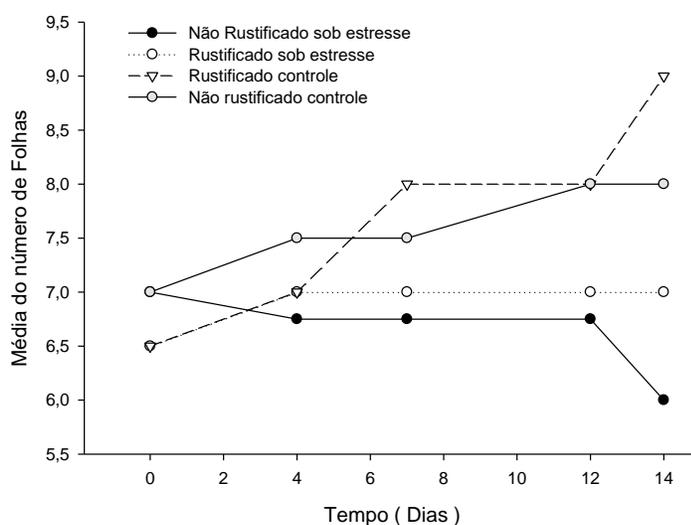


Figura 18: Número de folhas em mudas do híbrido urograndis ao longo de 14 dias.

Observa-se em mudas sob déficit hídrico, ao longo do experimento, que houve redução na taxa fotossintética (fig. 19). Mudas rustificadas apresentaram redução de 74,2% na taxa entre o início e o final do experimento. A partir do quarto dia de avaliação esse tratamento diferencia-se do grupo rustificado controle ( $p < 0,05$ ), permanecendo assim até o fim do experimento. Mudas não rustificadas apresentaram queda de 90,5%, na taxa fotossintética entre a primeira e a última mensuração, diferenciando do grupo não rustificado controle a partir do quarto dia e permanecendo assim até o último dia de avaliação. Mudas rustificadas diferenciaram das não rustificadas ( $p < 0,05$ ) também a partir do quarto dia e a maior diferença entre eles foi no último dia no qual as mudas rustificadas apresentaram um valor de 52,5% a mais na taxa de  $A$  em comparação com as mudas não rustificadas. O decréscimo acentuado na taxa fotossintética é uma resposta comum ao déficit hídrico (HUANG et al., 2013; SERGEANT et al., 2011; KOTTAPALLI et al., 2009; WADE et al., 2002) e pode estar associada a alterações bruscas na síntese de proteínas relacionadas à fotossíntese durante o estresse como RuBisCO, RuBisCO ativase, proteínas de interação com clorofila a/b e proteínas do complexo oxidativo (PINHEIRO et al., 2014).

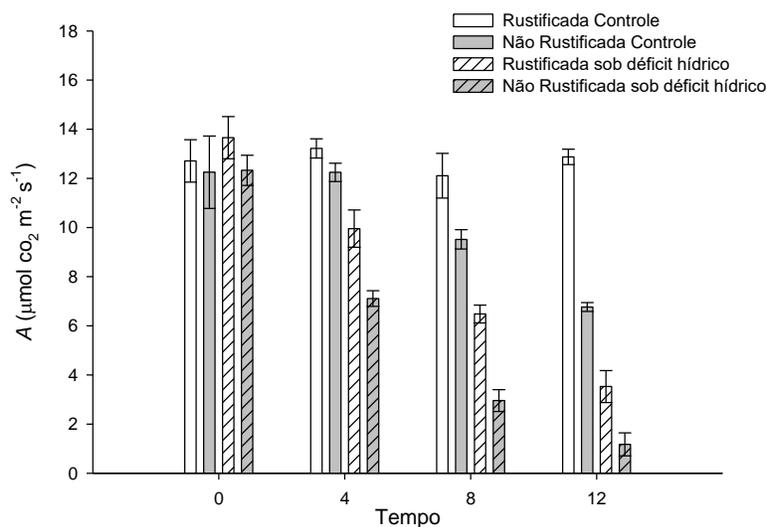


Figura 19: Fotossíntese de mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico. Barras indicam o erro padrão (n=5). Mudas rustificadas e não rustificadas diferenciam significativamente do grupo controle a partir do quarto dia ( $p < 0,05$ ).

O estresse hídrico intenso causa modificações danosas ao metabolismo da planta, afetando a taxa fotossintética (GUIDI et al., 2008). A queda menos acelerada na taxa de fotossíntese, entre outros efeitos negativos da deficiência hídrica, pode ser evidenciada em mudas rustificadas e um dos fatores que pode exercer influência sob isso é o fato de que a atividade da enzima RuBisCO pode ser aumentada em mudas supridas por potássio (MENDES et al., 2013; MARSCHNER, 1995). Dessa forma, plantas supridas com potássio tendem a ter maior taxa fotossintética além de melhor controle estomático por estarem diretamente relacionado ao turgor das células guarda pelo melhor controle das diferenças no potencial osmótico (MARSCHNER, 1995), evidenciando assim a importância da suplementação desse elemento na rustificação.

Associado a redução na fotossíntese também houve uma queda rápida na taxa de transpiração. Em mudas rustificadas sob déficit hídrico a transpiração ( $E$ ) variou de  $3,1 \text{ mmol H}_2\text{O.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no primeiro dia para  $0,93 \text{ mmol H}_2\text{O.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no último dia, esse tratamento diferenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle rustificado a partir do oitavo dia. Enquanto que em mudas não rustificadas em déficit hídrico a variação foi de  $2,83 \text{ mmol H}_2\text{O.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para  $0,34 \text{ mmol H}_2\text{O.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  no último dia, diferenciando do grupo controle não rustificado a partir do quarto dia. Quando comparados os tratamentos de mudas rustificadas e não rustificadas a única diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi no quarto dia, nessa ocasião mudas rustificadas apresentaram  $E$  de  $2,98 \text{ mmol H}_2\text{O.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e mudas não rustificadas apresentaram média de  $1,25 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (fig. 20). Essa tendência pode estar associada a ajustes metabólicos como alterações bruscas nas rotas de metabolismo de aminoácidos, carbono e nitrogênio (PINHEIRO et al., 2014; KOTTAPALLI et al., 2009).

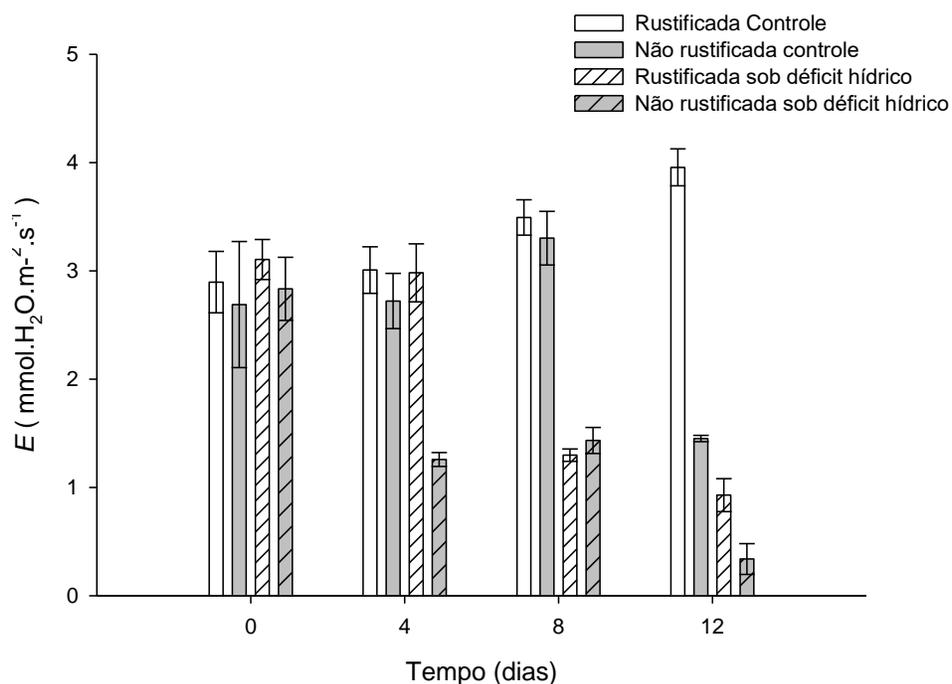


Figura 20: Taxa de transpiração ( $E$ ) em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 14 dias. As barras representam o erro padrão ( $n=5$ ). Mudas não rustificadas diferenciaram significativamente do controle a partir do dia 4 e as rustificadas a partir do dia 8 ( $P<0,05$ )

A redução na taxa de transpiração é uma das respostas observadas em plantas sob estresse hídrico 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 morte de tecidos (GALMES et al., 2007; WARREN et al., 2007; PITA e PARDOS, 2001). Em *Eucalyptus camaldulensis* foi relatado a queda de  $E$  juntamente com a queda em taxas de  $g_s$  e essa interação aponta para uma estratégia que pode ser adotada pela espécie para evitar a perda de água (UTKHAO e YINGJAJAVAL, 2015).

Taxas de transpiração mais baixas, em decorrência do fechamento estomático, podem estar associadas à ação do ABA, diversos genes ativados pela seca foram induzidos por tratamentos exógenos de ABA, enquanto outros permaneceram inativos, provavelmente por serem dependentes de outros estímulos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2005). Esse mecanismo contribui para que a planta resista as condições de déficit hídrico.

Mudas rustificadas, sob estresse hídrico, apresentaram média de  $g_s$  variando de  $0,26 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $0,04 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Essa taxa diferenciou significativamente do grupo de mudas rustificadas sem estresse (controle) a partir do oitavo dia ( $p < 0,05$ ). Mudas não rustificadas sob estresse hídrico apresentaram variação em  $g_s$  de  $0,21 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a  $0,01 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  esse grupo diferenciou do grupo não rustificado controle a partir do quarto dia.

Quando comparados os tratamentos de mudas rustificadas e não rustificadas sob estresse pode-se verificar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos dias 4 no qual mudas rustificadas apresentaram  $g_s$  de  $0,23 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e mudas não rustificadas  $0,06 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e no oitavo dia em que mudas rustificadas apresentaram média de  $0,26 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e mudas não rustificadas  $0,1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . A taxa de fotossíntese pode ser influenciada pela condutância estomática (fig. 19 e 21). Como já observado em *Eucalyptus grandis*, a medida que o estresse hídrico se torna mais severo e o potencial hídrico diminui ocorre também diminuição em ambas as taxas ( $g_s$  e  $A$ ). (BATTIE-LACLAU et al., 2014).

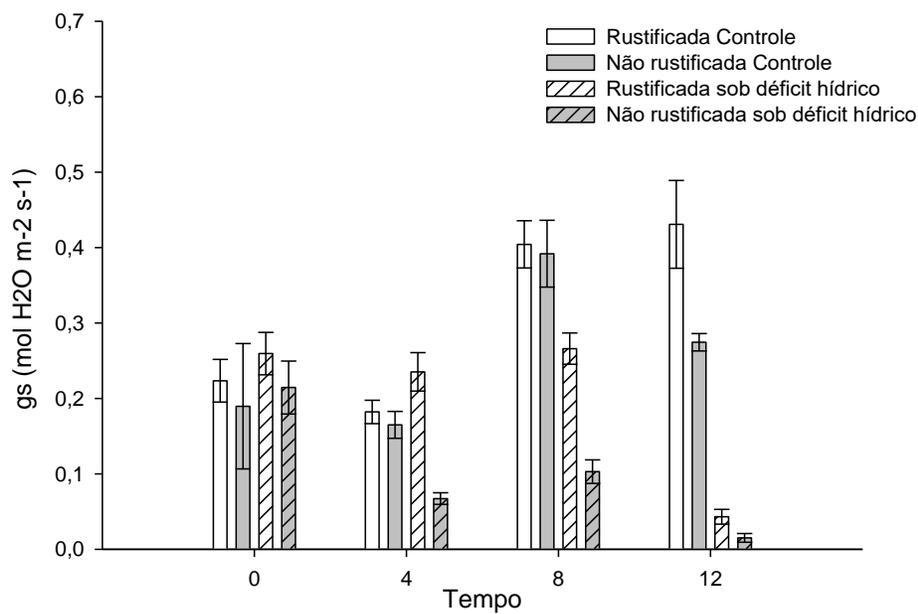


Figura 21: Condutância estomática ( $g_s$ ) em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 14 dias. Barras representam o erro padrão ( $n=5$ ). Mudas não rustificadas diferenciaram significativamente do grupo controle a partir do 4º dia e mudas rustificadas a partir do 8º.

A concentração de carbono intercelular na folha ( $C_i$ ) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) variou em mudas rustificadas em estresse de 263,7 a 204,6, diferenciando das mudas rustificadas sem estresse (controle) apenas no último dia ( $P<0,05$ ) no qual o tratamento controle obteve taxa de 325,3 (fig. 22). Mudas não rustificadas, sob déficit hídrico, obtiveram taxa de variação de  $C_i$  de 255,6 para 174,8, diferenciando das não rustificadas controle nos dias 4 e 12, o grupo não rustificado controle apresentou médias de 281,4 no 4º dia e 312,5 no 12º. Na comparação das mudas rustificadas e não rustificadas em estresse hídrico, houve diferença

significativa ( $P < 0,05$ ) no quarto dia no qual mudas rustificadas apresentaram média de 299,4 e mudas não rustificadas foi de 142,8.

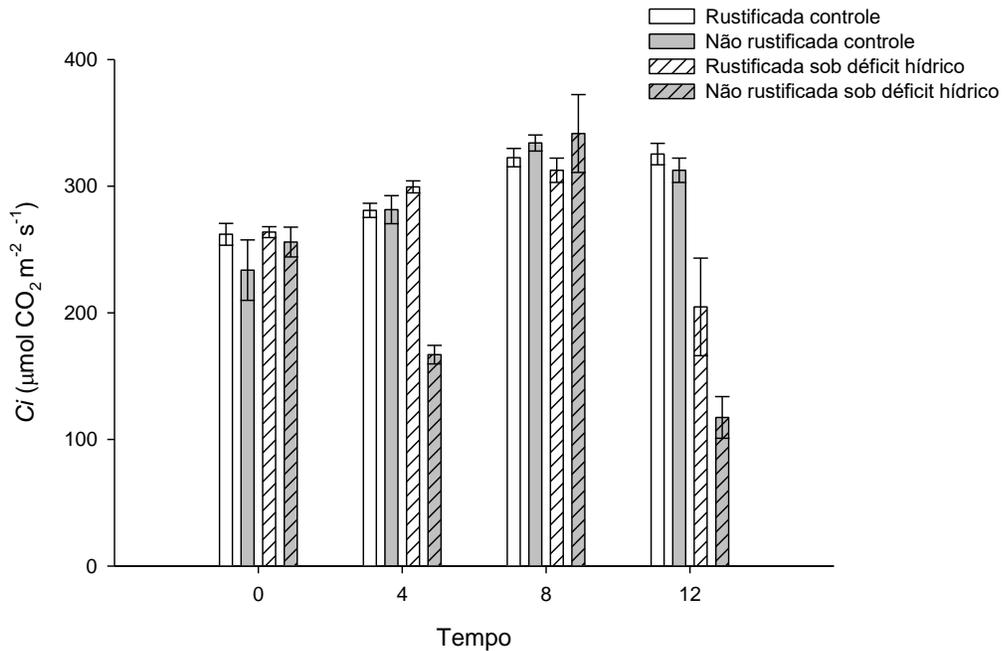


Figura 22: Concentração de carbono ( $\text{CO}_2$ ) intracelular foliar em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 12 dias. Barras indicam o erro padrão ( $n=5$ ). Mudas não rustificadas diferenciaram do grupo controle no 4º e 12º dia e rustificadas no 12º dia ( $P < 0,05$ )

A concentração de  $C_i$  é influenciada por fatores atmosféricos podendo ser mediada pela interação desses com a planta através dos estômatos, pela taxa fotossintética, condutância estomática e concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférico (LAWSON et al., 2014). Diversos tipos de estresse ambiental ocasionam a redução nos níveis de  $C_i$ . Essas alterações favorecem a formação de oxigênio reativo celular, o qual pode permanecer nesse estado por períodos curtos ( $4\mu\text{s}$  em

água) podendo reagir com proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos e lipídeos, além da morte de tecidos (HATZ, 2007). Conseqüentemente, níveis de enzimas antioxidantes podem sofrer alterações para amenizar danos provocados por essa espécie reativa.

Analisando-se as enzimas SOD, CAT e MDHAR verificou-se aumento na atividade dessas ao longo do período que as mudas foram submetidas ao déficit hídrico, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as mudas rustificadas e não rustificadas no último dia, demonstrando que, a rustificação prepara as mudas para enfrentar possíveis estresses após o plantio.

Na avaliação da atividade da enzima SOD, ao longo do período de estresse hídrico, verificou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, no estresse hídrico, até o 8º dia, entretanto, no décimo segundo dia após a suspensão da irrigação, verificou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) da atividade dessa enzima em mudas rustificadas (fig 23) e ficou evidenciado a diferença entre as mudas rustificadas e não rustificadas nesse dia.

A enzima SOD faz parte de um grupo de enzimas antioxidantes com ação intracelular presente em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos sub celulares propensos ao estresse oxidativo originado por espécies reativas de oxigênio (EROs). Essa enzima remove  $O_2^-$  catalisando sua dismutação, sendo um  $O_2^-$  reduzido a  $H_2O_2$  e outro oxidado a  $O_2$  (GILL e TUTEJA, 2010). Ao comparar a ação de diferentes enzimas antioxidantes em *Eucalyptus globulus* sob estresse hídrico, SHVALEVA et al., (2005) concluíram que a SOD responde mais rapidamente que outros grupos de enzimas antioxidantes como, por exemplo, a catalase, sendo, portanto, importante na tolerância ao estresse de plantas por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos provocados pelo surgimento e acúmulo de EROs.

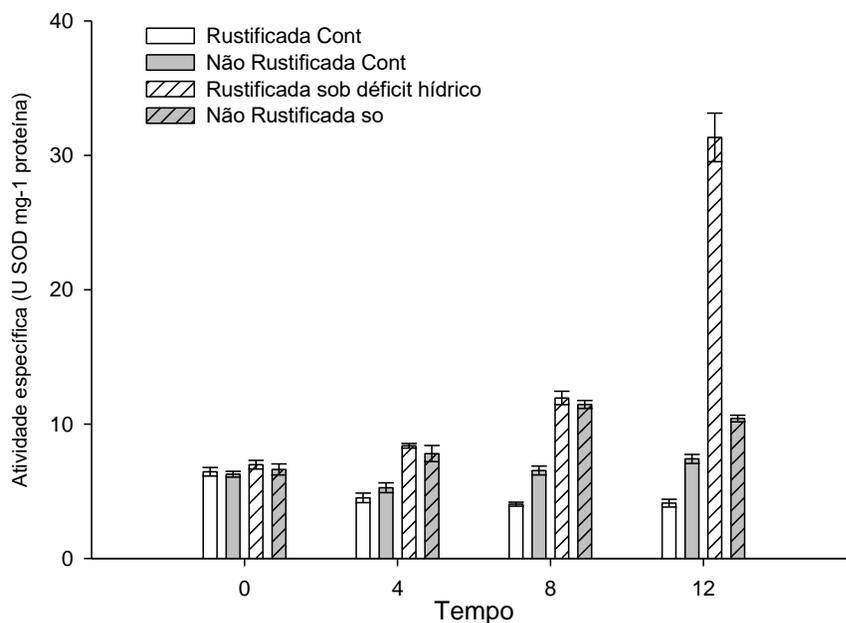


Figura 23: Atividade específica da enzima SOD em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 12 dias. Barras indicam o erro padrão da média (n=4). Os grupos de mudas rustificadas e não rustificadas diferenciaram significativamente do grupo controle a partir do 4 ° dia ( $P < 0,05$ )

Para a atividade da catalase, houveram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,001$ ). Verifica-se que até o oitavo dia após o início do estresse, mudas em déficit hídrico apresentaram aumento na atividade da enzima, entretanto, com o aumento do estresse, no décimo segundo dia, foi verificado aumento na atividade da enzima de mudas rustificadas quando comparado com mudas não rustificadas e controle (não estressadas) (fig. 24). Esse resultado indica que essa enzima pode estar associada à resposta de plantas ao estresse causado pela seca. Em estudos com *Pinus* também foi observada maior atividade da catalase quando houve exposição das plantas a um estresse hídrico de mais de 14

dias (GAO et al., 2009), porém em alguns estudos realizados com eucalipto, verifica-se que essa enzima não tem alteração na sua atividade em situações de estresse hídrico (TURKAN et al., 2005; SHVALEVA et al., 2005).

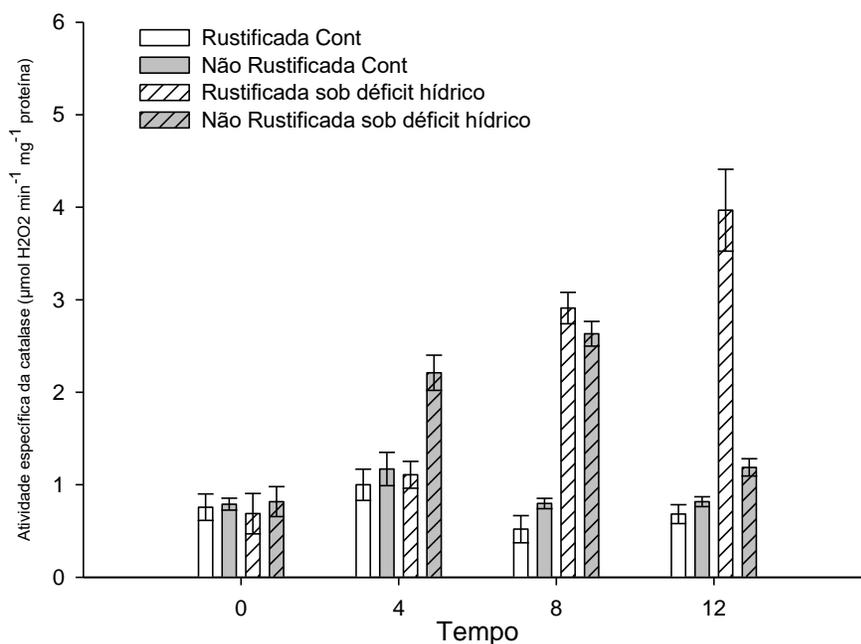


Figura 24: Atividade específica da enzima catalase em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 12 dias. Barras indicam o erro padrão da média (n=4). Mudas não rustificadas diferenciaram significativamente do grupo controle a partir do 4° dia e não rustificadas a partir do 8° dia.

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 e TUTEJA, 2010), sendo, portanto, indispensável para a remoção de EROs durante condições de estresse. Em

comparação com outras enzimas antioxidantes, as enzimas CAT apresentam uma maior quantidade de clusters de codificação de isoformas apresentando, portanto, alta eficiência em sua síntese em *Eucalyptus* (TEIXEIRA et al., 2005).

Geralmente condições ambientais estressantes são responsáveis pelo aumento da atividade da CAT (ZHUN et al., 2004; TONIN, 2005), entretanto, condições altamente estressantes podem acarretar em alterações estruturais nas proteínas e levar à diminuição na taxa de atividade enzimática caracterizando a sua degradação (BROETTO et al., 2002). Sendo assim, pode-se observar o aumento progressivo da atividade enzimática em mudas rustificadas e a queda na taxa de atividade de CAT em mudas não rustificadas entre os dias 8 e 12, podendo essa queda estar associada à inativação enzimática pelo estresse. Alterações na atividade de CAT também podem estar relacionadas com o aumento da taxa de respiração celular, podendo estar associado a alterações de vias metabólicas relacionadas com desenvolvimento vegetativo (WILLEKENS et al., 1994). Assim como já relatado por Teixeira et al. (2005), estes resultados sugerem grande importância da catalase para o metabolismo anti oxidativo.

A atividade da enzima MDHAR apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,001$ ), seguindo o mesmo padrão observado nas outras enzimas estudadas, em que as mudas rustificadas apresentam maior atividade enzimática em comparação as mudas não rustificadas.

A enzima MDHAR é um dos principais componentes do ciclo AsA-GSH. Essa enzima monomérica utiliza NADPH como doador de elétrons para reduzir o monodeidroascorbato (MDHA) à ascorbato (AsA) (HOSSAIN et al., 1984). Em *Eucalyptus grandis* 4 grupos foram identificados como isoformas de MDHAR, atuantes em diferentes locais como citosol, membrana celular e cloroplasto (TEIXEIRA et al., 2005). Foi verificada diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na atividade da enzima MDHAR entre os tratamentos (fig. 25). A atividade da

MDHAR permanece baixa e constante nos tratamentos não submetidos ao déficit hídrico, entretanto, nas mudas rustificadas e não rustificadas em estresse hídrico observa-se aumento da atividade enzimática a partir do oitavo dia, atingindo maior valor no décimo segundo dia.

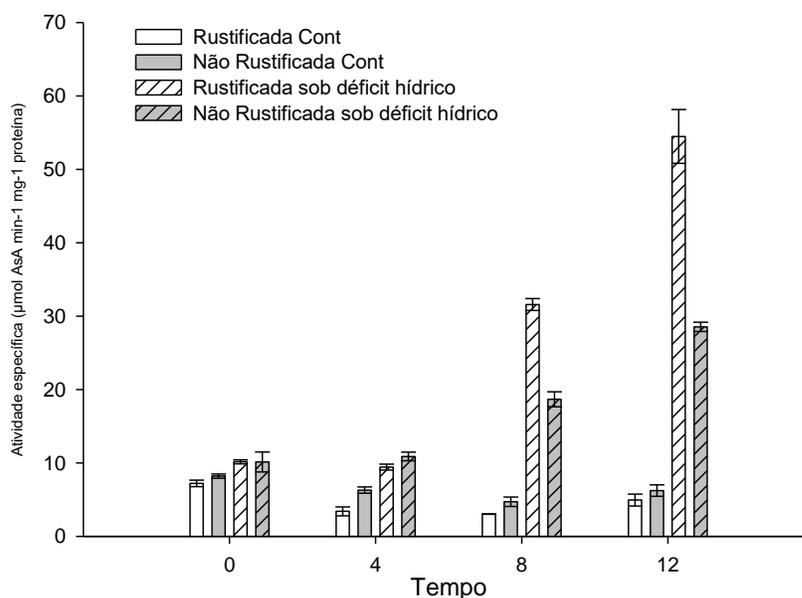


Figura 25: Atividade específica da enzima MDHAR em mudas rustificadas e não rustificadas, submetidas ao déficit hídrico por 12 dias. Barras indicam o  $\pm$  erro padrão da média (n=4). Mudanças rustificadas e não rustificadas diferenciaram significativamente do grupo controle a partir do 4<sup>o</sup> dia.

À medida em que o estresse se intensifica, maior é a atividade da enzima MDHAR e esse fator pode ser observado pelo aumento gradativo do produto oriundo da redução da espécie reativa MDHA pela redutase (MDHAR) gerando ascorbato. Resultados semelhantes foram também relatados por Gao et al. (2009).

Assim como a ascorbato peroxidase (APX), MDHAR possui alta atividade em mitocôndrias e peroxissomos de onde inativam EROs (DEL RIO et al., 2002).

#### **4 Conclusão**

Conclui-se que mudas rustificadas apresentam modificações fisiológicas tais como atividade das enzimas antioxidantes, maior taxa de fotossíntese (A) e condutância estomática (gs), aumento no número de folhas novas e aumento do período para visualização de sintomas de murcha. Essas alterações podem aumentar a chance de sobrevivência, especialmente em caso da ocorrência de estresse hídrico severo por um período de até 14 dias após o plantio.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNDT S.; et al. Quercitol and osmotic adaptation of field-grown *Eucalyptus* under seasonal drought stress. **Plant Cell Environ**, Melbourne, v.31, p. 915–24. 2008.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Helsink, v. 48, p. 359-373, 2010.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal. Biochem**, Georgia, Athens, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROETTO, F.; LÜTTGE, R. Influence of light intensity and salt-treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *Mesembryanthemum crystallinum*. **Functional Plant Biol**, Amsterdam, v. 29, p. 13-23, 2002.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Sydney, v. 103, p. 551–560, 2009.

COSTA E SILVA, F.; et al. Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. **Tree Physiology**, Tapada da ajuda, v. 29, p. 77–86, 2009.

DEL RIO L.; SANDALIO L.; CORPAS F.; BARROSO J. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiol**, Granada, v. 141, p. 330–335. 2006.

GALMES J.; ABADIA A.; MEDRANO H.; et al. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. **Environ Exp Bot**, Madrid, v. 60, p. 308–17. 2007.

GAO, D.; et al. Physiological responses to gradual drought stress in the diploid hybrid *Pinus densata* and its two parental species. **Trees - Structure and Function**, Lanzhou, v. 23, p. 717–728, 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I, occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Delhi, v. 48, p. 909–930, 2010.

GRANDA V.; et al. Physiological and biochemical responses to severe drought stress of nine *Eucalyptus globulus* clones: a multivariate approach. **Tree Physiol**, Stanford, 34:778–786, 2014.

GUIDI, L. e DEGLINOCENT **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**, Beijingv. 3, n. 2, p. 79–87, 2010.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HATZ S., LAMBERT J., OGILBY P., Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability, **Photochem. Photobiol**, Zurich, v. 6, p. 1106-1116, 2007.

HOSSAIN MA, NAKANO Y, ASADA K. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. **Plant Cell Physiol**, Kyoto. 25:385–395,1984.

HUANG, X.; LIU, Y.; LI, J. The response of mulberry trees after seedling hardening to summer drought in the hydro-fluctuation belt of Three Gorges Reservoir Areas, **Envi Sci Pollut Res**, Chongqing, v.29, p. 7103–7111, 2013.

IBÁ. **Relatório Anual**. Indústria Brasileira de Árvores, p. 100, 2016.

JESUS, C.; **Salicylic acid and drought tolerance improvement in *Eucalyptus***. 2014. p. 62. Dissertação (mestrado em engenharia florestal). Universidade de Aveiro, Portugal, 2014.

KOTTAPALLI, K. R., RAKWAL, R., SHIBATO, J., BUROW, G., Tissue, D., Burke, J., et al. Physiology and proteomics of the water- deficit stress response in

three contrasting peanut genotypes. **Plant, Cell and Environment**, Ontario, v.12, p.380–407, 2009.

LAWSON T, SIMKIN AJ, KELLY G, GRANOT D. Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. **New Phytol**, Bet-Dagan v. 203, p. 1064-1081, 2014.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **San Diego**: Academic, 1995.

MENDES S. J. H., DE PAULA N. F., SCARPINATTI E. A., DE PAULA R. C. Respostas Fisiológicas de Genótipos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus Urophylla* à disponibilidade hídrica e adubação potássica. **Cerne**, Lavras v.19,603-611, 2013.

MENCUCCINI, M. Temporal scales for the coordination of tree carbon and water economies during droughts. **Journal of Refugee Studies**, Roma v. 34, n. 5, p. 439–442, 2014.

MORALES C.; PINO M.; DEL POZO A. Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. **Sci Horti** , Buenos Aires, 162:234–241. 31:915–924.

MYERS, B. J.; LANDSBERG, J. J. Water stress and seedling growth of two eucalypt species from contrasting habitats. **Tree physiology**, Istambul v. 5, n. 2, p. 207–18, jun. 1989.

NUNES, C. M. J. **Caracterização da resposta ao déficit hídrico de linhas transgênicas de *Medicago trunculata* cv. Jemalong**. 2007. 64p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia), Universidade de Lisboa, Lisboa – Portugal, 2007.

OSORIO, J.; OSORIO, M.L.; CHAVES, M.M. and PEREIRA, J.S. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Cusco, v. 18, p. 363-373, 1998.

PINHEIRO, C. et al. Proteomics: State of the art to study Mediterranean woody species under stress. **Environmental and Experimental Botany**, Lisboa, v. 103, p. 117–127, jul. 2014.

PITA P.; PARDOS J.; Growth, leaf morphology, water use and tissue water relations of *Eucalyptus globulus* clones in response to water deficit. **Tree Physiol**, Amsterdam, v. 21, 599–607, 2001.

SAKAMOTO A.; MURATA N (2000) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **J Exp Bot**, Tokyo v.51, p.81–88.

SERGEANT, K.; et al. One dry summer: A leaf proteome study on the response of oak to drought exposure. **Journal of proteomics**, Madagascar, v. 3, p.1385–1395, 2011.

SHVALEVA, A L.; et al. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree physiology**, Madrid v. 26, n. 2, p. 239–248, 2006.

STAPE, J.L.; GONÇALVES, J. L.; GONÇALVES, A. N. Relationships between nursery practices and field performance for *Eucalyptus* plantations in Brazil. **New Forests**, v. 22, p. 19-41, 2001.

TEIXEIRA F. **Influência Da Rustificação No Comportamento Fisiológico De Mudanças De *Eucalyptus Urograndis* Submetidas Ao Défice Hídrico**. 2012. p. 92. Dissertação (Mestrado em engenharia florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

TEIXEIRA, F. K.; et al. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. **Genetics and Molecular Biology**, Lavras v. 28, p. 529–538, 2005.

TONIN, F.B. **Atividade de enzimas antioxidativas e absorção de silício em plantas de pimentão submetidas a estresse salino**. 93 p. Dissertation (Agronomy-Horticulture) Botucatu, UNESP/FCA. 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**, v. 29, n. 5, p. 1581–1592, 2015.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; SHINOZAKI K. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Yokohama, v. 10, p. 88–94. 2005.

WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, Missouri, v. 2, p. 1131–1145, 2002.

WARREN C, BLEBY T, ADAMSM Changes in gas exchange versus leaf solutes as a means to cope with summer drought in *Eucalyptus marginata*. **Oecologia, Jonesburg**, v. 154, p.1–10. 2007.

WILLEKENS H, et al. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.), **Proc. Natl. Acad. Sci.** 91; 10450-10454, 1994.

ZHUJUN, Z., W. GUOQUIANG, L. JUAN, Q. Qiongqiu and Y. Jingquan. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Sci**, Hangzhou, v.167, p.527-533. 2004.

ZLATEV, Z. AND F. C. LIDON. An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. **Emir. J. Food Agric**, Plovdiv, v. 24, p. 57-72. 2012.

## ANEXO A – Tabelas de análises fisiológicas e moleculares

Tabela 3 – Média de clorofila total (mg/cm<sup>2</sup>) em mudas em rustificação e não rustificadas.

Tempo (dias)	Clorofila total (mg/cm <sup>2</sup> )		
	Tratamentos		
	Em rustificação	Não rustificada	
0	0.027 Ac	0.029 Ac	
4	0.032 Aab	0.033 Abc	
9	0.029 Bbc**	0.036 Ab	
14	0.036 Aa	0.037 Ab	
18	0.033 Bab**	0.042 Aa	
24	0.036 Ba**	0.043 Aa	
28	0.031 Bab**	0.043 Aa	
30	0.032 Bab**	0.045 Aa	
Fc	Condição 70.34	Tempo 16.57	Cond*Tempo 10.25
DMS	0.0013		
CV%	5.63		

Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os diferentes tratamentos no mesmo dia (linha) e letras minúsculas representam diferenças no mesmo tratamento ao longo dos dias (coluna), analisados pelo teste de Tukey (P≤0,05). \* simboliza P<0,01 e \*\* P<0,001 entre os diferentes tratamentos no mesmo dia.

Tabela 4 – Atividade da CAT, SOD e MDHAR em mudas em rustificação (ER) e não rustificadas (NR).

Dias	CAT, SOD e MDHAR de mudas em rustificação e não rustificadas					
	CAT		SOD		MDHAR	
	ER	NR	ER	NR	ER	NR
1	0.65 Aa	0.62 Aa	10.99 Ac	10.69 Aa	3.03 Ab	4.54 Aa
7	0.91 Aa	0.31 Ba	17.19 Ab**	5.2 Bb	10.02 Aab	3.06 Aa
14	0.82 Aa	0.31 Ba	16.36 Ab**	5.53 Bb	12.81 Aab	3.12 Aa
22	1.23 Aa*	0.41 Ba	21.88 Aa**	5.36 Bb	20.01 Aa	4.58 Ba
Fc cond.	21.15		12.01		7.81	
DMS	0.22		0.05		11.03	
CV (%)	39.4		6.58		87.2	

Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os diferentes tratamentos no mesmo dia (linha) e letras minúsculas representam diferenças no mesmo tratamento ao longo dos dias (coluna), analisados pelo teste de Tukey (P≤0,05). \* simboliza P<0,01 e \*\* P<0,001 entre os diferentes tratamentos no mesmo dia.

Tabela 5 – Média das variáveis  $A$  ( $\mu\text{Mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $g_s$  ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )  $E$  ( $\text{mol. H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e  $EUA$  ( $\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$ ).

Condição	Tratamento							
	Déficit hídrico				Controle			
	Tempo (dias)				Tempo (dias)			
	0	4	8	12	0	4	8	12
Rust (A)	13,66 Aa	9,95 Ba*	6,48 Ba**	3,52 Ba	12,71 Aa	13,22 Aa	12,10 Aa*	12,87 Aa**
Nrust (A)	12,32 Aa	7,11 Bb	2,95 Bb	1,17 Bb	12,25 Aa	12,24 Aa	9,52 Ab	6,76 Ab
Rust ( $g_s$ )	0,26 Aa	0,23 Aa**	0,26 Ba*	0,04 Ba	0,22 Aa	0,18 Aa	0,4 Aa	0,27 Ab*
Nrust ( $g_s$ )	0,21 Aa	0,06 Bb	0,1 Bb	0,01 Ba	0,19 Aa	0,16 Aa	0,39 Aa	0,43 Aa
Rust (Ci)	263,7 Aa	299,4 Aa**	312,5 Aa	204,6 Ba	261,9 Aa	280,8 Aa	322,4 Aa	325,3 Aa
Nrust (Ci)	255,6 Aa	142,8 Bb	341,5 Aa	174,8 Aa	233,4 Aa	281,4 Aa	334 Aa	312,5 Aa
Rust (E)	3,1 Aa	2,98 Aa**	1,29 Ba	0,93 Ba	2,98 Aa	3 Aa	3,49 Aa	3,95 Aa**
Nrust (E)	2,83 Aa	1,25 Bb	1,43 Ba	0,34 Ba	2,94 Aa	2,72 Aa	3,3 Aa	1,45 Ab
Rust (EUA)	4,46 Aa	3,38 Ab**	5 Aa**	4 Aa**	4,48 Aa	4,45 Aa	3,49 Ba	3,26 Ab*
Nrust (EUA)	4,43 Aa	5,69 Aa	2,1 Ab	1,81 Bb	4,65 Aa	4,59 Aa	2,95 Aa	4,66 Aa

Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre as médias da condição em diferentes tratamentos no mesmo dia (linhas) e letras minúsculas representam diferenças significativas entre as condições em um tratamento no mesmo dia (coluna) analisados pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). \* simboliza  $P < 0,01$  e \*\*  $P < 0,001$  entre as diferentes condições no mesmo dia.

Tabela 6 – Atividade da CAT, SOD e MDHAR ao longo do experimento.

Condição	Tratamento							
	Déficit hídrico				Controle			
	Tempo (dias)				Tempo (dias)			
	0	4	8	12	0	4	8	12
Rust (SOD)	6,72 Aa	8,38 Aa	11,94 Aa	31,33 Aa**	6,70 Aa	4,50 Ba	4,04 Bb*	4,11 Bb**
Nrust (SOD)	6,62 Aa	7,80 Aa	11,45 Aa	10,41 Ab	6,26 Aa	5,26 Ba	6,54 Ba	7,41 Ba
Rust (CAT)	0,68 Aa	1,10 Aa**	2,91 Aa	3,96 Aa**	0,75 Aa	1,00 Aa	0,52 Ba	0,68 Ba
Nrust (CAT)	0,81 Aa	2,21 Ab	2,63 Aa	1,18 Ab	0,79 Aa	1,17 Ba	0,79 Ba	0,81 Aa
Rust (MDHAR)	10,14 Aa	9,43 Aa	31,58 Aa**	54,47 Aa**	7,20 Aa	3,40 Ba	3,01 Ba	4,94 Ba
Nrust (MDHAR)	10,13 Aa	10,88 Aa	18,67 Ab	28,53 Ab	8,20 Aa	6,29 Ba	4,70 Ba	6,23 Ba

Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre as médias nos diferentes tratamentos em mesmo tempo (linhas) e letras minúsculas representam diferenças significativas em um só tratamento sob mesmo tempo (coluna) analisados pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). \* simboliza  $P < 0,01$  e \*\*  $P < 0,001$  entre as diferentes condições no mesmo dia.

## ANEXO B – Ação de genes e moléculas em resposta ao estresse hídrico

Tabela 7 – Relação simplificada da ação de genes e moléculas em resposta ao estresse hídrico. (continua)

GENE	RESPOSTA À SECA	ORGANISMO	AUTOR
RD29B	Controle da expressão de ABA aumentando a síntese	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Uno et al., 2030
ABF3	Baixa taxa de transpiração, aumenta tolerância ao estresse	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ciarmiello, et al., 2011; Choi et al., 2000; Uno et al., 2000
AREB2/ABF4	Baixa taxa de transpiração, aumenta tolerância ao estresse	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ciarmiello, et al., 2011; Choi et al., 2000; Uno et al., 2001
Eucgr.L01022	Aumenta a síntese de proteínas de reparo no P511	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.000146	Aumenta a síntese de carboxipeptidase (parede celular)	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.102395	Síntese de proteínas LEA	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.B02163	Síntese de proteína lipase/acilhidrolase	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.L02980	Síntese de heat shock protein	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
CUFF.15800	síntese de glicol hidrolase	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.K03583	Síntese de proteína lipase/acilhidrolase	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.H00093	síntese de pectina	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.F04203	Fator de resposta ao etileno	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.G01115	Síntese de serina carboxi peptidase	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.001388	Síntese de proteínas inibidoras bifuncionais	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
Eucgr.000148	Síntese de serina carboxi peptidase	<i>E. camaldulensis</i>	Thumma et al. 2012
AtGolS1 e 2	Diminuição da taxa de transpiração	<i>E. camaldulensis</i>	Taji et. al., 2002
COX	Síntese de glicina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nyysola et al., 2070
AtNCED3	Biossíntese de ABA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	De Block et al., 2005; Iuchi et al., 2001
ERD1	Biossíntese de ácido jasmônico	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Olias et al., 2012; Lam-Son Phan Tran et al. 2004
PBS3 EPSI	Biossíntese AS	<i>E. globulus</i>	Jesus 20014; Zhixiang Chen et al., 2009
Arginina decarboxilase 2 (ADC2)	Diminuição da taxa de transpiração	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Akázár et al., 2010
IPT 1,4,5,6 E8	Reduz níveis endógenos de citocinina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kieber, J.J. e Schaller, G.E 2014
AHP1-5	Inibidor da sinalização para citocinina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	S. et al, 2012; Kieber, J.J. e Schaller, G.E (2014)
AHK2, AHK3	Regula a expressão downstream de genes	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Weiqliang Li et al., 2016; Sukbong Ra et al., 2012
CKKs	Degrada citocina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Werner, T. et al. 2001, 2003

PIN1, 2, 4, AUX1	Reguladores do gravitropismo radicular	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ruzicka et al., 2007
ARF2 and ARF19	Regula a síntese de auxina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Li 1, et al. 2006; Li H, et al., 2004
RD26	Media interação entre brasinosteroides e ABA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tang, 2015 tese

(Conclusão)