

NAIRAM FÉLIX DE BARROS FILHO

**DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO ^{13}C E NUTRIÇÃO COM CÁLCIO E BORO
EM CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS AO DÉFICE HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B277d
2014

Barros Filho, Nairam Félix, 1975-
Discriminação isotópica do ¹³C e nutrição com cálcio e
boro em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico /
Nairam Félix Barros Filho. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Júlio César Lima Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Nutrição. 2. Carbono - Isótopos. 3. Cálcio.
4. Boro. 5. Déficit hídrico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Solos. Programa de Pós-graduação em Solos e
Nutrição de Plantas. II. Título.

CDD 22. ed. 633.973766

NAIRAM FÉLIX DE BARROS FILHO

**DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO ^{13}C E NUTRIÇÃO COM CÁLCIO E BORO
EM CLONES DE EUCALIPTO SUBMETIDOS AO DÉFICE HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 28 de março de 2014

Prof. Leonardus Vergütz

Prof. Wagner Luiz Araújo

Prof. Genelício Crusoé Rocha

Prof. Mauro Valdir Schumacher

Prof. Júlio César Lima Neves
(Orientador)

“Na medida em que vamos prestando a devida atenção, a Natureza torna-se uma grande escola. Existem algumas regras que, se observadas, fazem com que a nossa vida torne-se mais fácil de ser entendida. Ser bem interpretada não quer dizer mais fácil de ser vivida. Não podemos nos esquecer de que o que passamos, merecemos...”

Saul Brandalise Jr.

Ao todo poderoso Deus
Aos meus pais Nairam e Maura,
A minha esposa Adriana,
Aos meus filhos Maria Eduarda e Gabriel

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, presença, coragem, força de vontade, e a vida que me proporciona.

Ao meu pai Nairam Félix de Barros por ser exemplo de homem e de pai, ensinando-me sobre a ciência e sobre a vida, apoiando minhas decisões e dando suporte para realização de meus sonhos.

À minha mãe Maura de Oliveira Barros pelo exemplo de vida, amor, carinho, dedicação, educação, esforço e incentivo.

À minha amada esposa Adriana Roberto e meus amados filhos Maria Eduarda Roberto Barros e Gabriel Roberto de Barros pelo simples fato de estarem sempre ao meu lado empenhando amor e carinho mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Andréa Barros Ribon, cunhado Rômulo Ribon e afilhado/sobrinho Vítor Barros Ribon e Arthur Barros Ribon pelo apoio e carinho.

Aos meus tios, tias e primos por completarem a alegria de uma vida em família.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos e Nutrição de Plantas pelos ensinamentos acadêmicos.

À CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudo.

À Empresa Plantar Reflorestamentos pelos ensinamentos e apoio para realização deste trabalho.

Ao Professor Júlio César Lima Neves pela orientação, confiança, críticas, sugestões incentivo e amizade durante a realização desse trabalho.

Ao Professor Ivo Ribeiro da Silva pela prontidão e sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos grandes amigos Bárbara, Samuel, Jeferson, Caio pelo apoio e amizade sempre presentes.

Aos amigos e colegas de curso Carol, Loane, Lorena, Jaílson, Ana, David, Gelton, Prof. Leonardus, Diogo, Adebayo, Manuel, Aline pelos bons momentos.

Aos competentes estagiários Augusto, Thais e Igor pela grande amizade e auxílio durante a execução do experimento.

A todos os funcionários do DPS.

Aos amigos de Viçosa e em especial aos amigos do Juca do Gás pelos momentos de descontração.

Ao grande amigo e companheiro de trabalho Gildo Xavier e sua esposa Lucilda por todo apoio dado nos quase três anos de convívio.

Aos amigos e companheiros de trabalho da TTG.

Aos amigos de Turmalina e do futebol pela amizade e momentos de descontração que tivemos.

Ao amigo e mentor Sebastião Machado pelo direcionamento profissional.

Ao amigo Emiliano que sempre deu força em todas as decisões por mim tomadas.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

NAIRAM FÉLIX DE BARROS FILHO, filho de Nairam Félix de Barros e Maura de Oliveira Barros, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 27 de janeiro de 1975.

Em março de 2001, graduou-se em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em Janeiro de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Silvicultura na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil, obtendo o título de Magister Scientiae em dezembro de 2003.

Em março de 2004, ingressou na Empresa Plantar Reflorestamentos, atuando nas áreas de pesquisa e produção de mudas clonais.

Em fevereiro de 2010 cursou disciplinas do programa de pós-graduação do departamento de solos da Universidade Federal de Viçosa, onde em julho de 2010 iniciou o Curso de Doutorado, concentrando seus estudos na área de fertilidade do solo e nutrição de plantas, terminando-o em Março de 2014.

Em julho de 2011, ingressou na Empresa TTG Brasil, atuando na área de gestão e nutrição florestal.

CONTEÚDO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1 - Crescimento, sobrevivência e discriminação de carbono em clones de eucalipto cultivados no Norte de Minas Gerais.....	2
RESUMO.....	2
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2 - Produção de matéria seca e trocas gasosas de clones de eucalipto influenciadas pelo cálcio e boro em diferentes condições hídricas.....	24
RESUMO.....	24
SUMMARY.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CONCLUSÕES GERAIS.....	52
APÊNDICE.....	53

RESUMO

BARROS FILHO, Nairam Félix de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Discriminação isotópica do ^{13}C e nutrição com cálcio e boro em clones de eucalipto submetidos ao déficit hídrico.** Orientador: Júlio César Lima Neves. Co-orientador: Ivo Ribeiro da Silva.

A expansão da cultura do eucalipto no Brasil tem ocorrido principalmente em áreas de cerrado, que possuem solos de baixa fertilidade e apresentam déficit hídrico prolongado. Os principais sintomas normalmente observados são a seca dos ponteiros, decorrente da deficiência de boro (B), seguida do lançamento de brotação lateral, e, ou, dessecação de folhas, da base para o ápice das árvores, comprometendo o crescimento e a sobrevivência. O emprego de clones mais tolerantes à seca e de fertilizantes minerais tem sido a estratégia comumente utilizada pelas empresas florestais na tentativa de minimizar os riscos de perdas e aumentar a produtividade florestal. A seleção de genótipos é um processo demorado e muitas das vezes não define os mecanismos responsáveis pela tolerância. A discriminação isotópica de ^{13}C (Δ) ou sua relação com a sobrevivência e crescimento das plantas tem sido sugerida como uma alternativa de seleção de genótipos tolerantes à seca. Estudos recentes têm mostrado a importância do B e do Ca na tolerância a diversos tipos de estresse, incluindo o hídrico. Esclarecimentos sobre o papel desses dois nutrientes na tolerância ao estresse hídrico e o desenvolvimento de métodos que permitam a seleção mais rápida e segura de materiais genéticos de eucalipto quanto à exigência hídrica são necessários. Desta forma, neste trabalho objetivou-se: 1 - Estabelecer relações entre a Δ , sobrevivência e crescimento de clones de eucalipto e precipitação pluviométrica na região norte de Minas Gerais, para identificar genótipos melhor adaptados a condições de baixa disponibilidade de água; 2 - Verificar a influência do Ca e do B na tolerância de clones de eucalipto à deficiência hídrica, a partir dos parâmetros fisiológicos, juntamente com a eficiência nutricional e de crescimento. Em campo, árvores de seis clones (i144, i224, i063, i182, 2486 e 3216), foram mensuradas e amostras de folhas e de lenho do tronco coletadas para a determinação da Δ . Foram medidos anualmente o diâmetro e altura e, a partir do quinto ano, o percentual de árvores afetadas (PAA) por estresse hídrico. Os

resultados mostraram correlação positiva entre crescimento e precipitação e entre Δ e crescimento, exceto para um dos clones. Apesar de ser constatada correlação negativa entre Δ e PAA, a utilização deste primeiro como ferramenta de seleção precisa ser mais bem entendida. Em casa de vegetação dois clones, um sensível (i042) e outro tolerante à restrição hídrica (i144), foram cultivados em solução de Clark modificada até completarem 14 dias. Após esse período, as mudas foram submetidas aos tratamentos em presença ou ausência de Ca e, ou, B até completarem 14 dias. Aproximados 30 dias, foi imposta restrição hídrica gradativa com PEG (Polietileno glicol) 6000, em 50 % dos vasos, reduzindo o potencial hídrico de -0,16 a -1,00 MPa (-0,16, -0,65 e -1,00 MPa), a cada sete dias. Na ocasião da aplicação de PEG foram determinadas matéria seca e trocas gasosas das plantas. Foram observadas diferenças entre os dois clones estudados em matéria seca total e trocas gasosas, sendo estas diferenças dependentes do estresse hídrico e da nutrição de Ca e B. No clone sensível, o B se mostrou mais importante na mitigação do estresse hídrico, ao passo que no clone tolerante o Ca foi relativamente mais importante que o B, o que pode estar ligado ao papel do Ca na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

ABSTRACT

BARROS FILHO, Nairam Félix de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2014. **Isotopic discrimination of ^{13}C and calcium and boron nutrition of eucalypt clones under water deficit.** Adviser: Júlio Cesar Lima Neves. Co-adviser: Ivo Ribeiro da Silva.

The expansion of eucalyptus plantations in Brazil have occurred mainly to areas of savanna, where soils have low fertility and climate is characterized by long dry seasons. The main symptoms observed are usually tip die back, as a result of B deficiency, followed by sprouting and/or desiccation of leaves from the base to the top of the trees, impairing growth and survival. The use of drought tolerant clones and mineral fertilizers has been the strategy used by forest companies as an attempt to minimize the risk of losses and to increase forest productivity. The selection of genotypes is a slow process and often does not define the mechanisms responsible for tolerance to drought. The ^{13}C isotope discrimination (Δ) and its relation to the survival and growth of plants have been suggested as an alternative method to select drought tolerant genotypes. Recent studies have shown the importance of B and Ca in tolerance to different types of stress, including water. Explanations of the function of these two nutrients in water stress tolerance and the development of methods that allow faster and safer selection of eucalypt genetic material to water requirement are needed. Thus, this study aimed to verify the influence of Ca and B tolerance of eucalypt clones to water stress, from the physiological parameters, along with the nutritional efficiency and growth and to establish relations between ^{13}C , survival and growth of eucalyptus clones and rainfall in the northern region of Minas Gerais State, Brazil, to identify genotypes well adapted to conditions of low water availability. In the countryside, trees of 6 clones (i144, i224, i063, i182, 2486 and 3216) were measured and samples of leaves and bole wood collected for the determination of ^{13}C isotope discrimination (Δ). Tree diameter and height were measured annually from the fifth year as well as the percentage of affected trees (PAA) by water stress. The results showed a positive correlation between growth and rainfall and between Δ and growth, except for one of the clones. Despite the existence of a negative correlation between Δ and PAA, the use of Δ to select eucalypt

for drought tolerance needs a better understanding. In the greenhouse two clones, a susceptible (i042) and a tolerant (i144) to water restriction were cultivated in a modified Clark solution during 14 days. After this period, the seedlings were subjected to the presence or absence of Ca and or B during 14 days. After the 30th day, gradual water restriction was imposed with PEG 6000, in 50 % of plants, reducing the water potential sequentially to -0.16, -0.65 and -1.00 MPa, in intervals of seven days. At the time of application of PEG, dry matter and gas exchange of the plants were determined. Differences were observed between the two clones in the total gas exchange and dry matter, and these differences were dependent on water stress and Ca and B nutrition. In the susceptible clone, B was more important in the mitigation of water stress while in the tolerant clone Ca was relatively more important than B, which may be linked to the function of Ca in the activity of the oxidative stress enzymes.

INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a principal essência florestal de cultivada no Brasil com fins comerciais, cobrindo uma área de, aproximadamente, cinco milhões de hectares. A expansão de seus plantios tem ocorrido principalmente para áreas com restrições hídricas e solos de baixa fertilidade. A obtenção de produtividades elevadas tem se baseado na seleção de materiais genéticos com maior tolerância a períodos secos mais prolongados e na adequada utilização de corretivos e fertilizantes. Em regiões com distribuição irregular de chuvas, como é o caso do Norte de Minas Gerais, a combinação de materiais genéticos tolerantes à seca e a aplicação de boro tem, dentro de certos limites, se mostrado efetiva na mitigação dos efeitos da seca. O boro tem papel importante na estabilidade da parede celular, dentre outras funções, e o suprimento em épocas adequadas reduz a seca de ponteiros, sintoma típico de sua deficiência em regiões sujeitas a períodos secos mais prolongados. O cálcio tem algumas funções semelhantes ao boro e sua deficiência pode também causar a seca de ponteiros em eucalipto. Métodos de seleção precoce de genótipos e o entendimento do papel do boro e do cálcio na mitigação dos efeitos da restrição hídrica são aspectos fundamentais para o maior sucesso dos plantios de eucalipto em regiões com restrições hídricas. O procedimento silvicultural tradicional de teste e seleção de materiais genéticos consiste em plantios no campo e o acompanhamento do desempenho dos genótipos ao longo do tempo. A irregularidade dos eventos climáticos, especialmente a distribuição das chuvas, que tem se intensificado nos últimos anos, fragiliza o procedimento usual de escolha de genótipos, visto que materiais selecionados no período de maior normalidade climática podem sucumbir quando eventos de seca mais prolongada acontecem.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer relações entre discriminação isotópica de carbono (Δ), sobrevivência e crescimento de clones de eucalipto e precipitação pluviométrica, na região norte de Minas Gerais, para identificar genótipos melhor adaptados a condições de baixa disponibilidade de água e estabelecer relações entre a Δ , sobrevivência e crescimento de clones de eucalipto e precipitação pluviométrica na região norte de Minas Gerais, para identificar genótipos melhor adaptados a condições de baixa disponibilidade de água; e verificar a influência do Ca e do B na tolerância de clones de eucalipto à deficiência hídrica, a partir de parâmetros fisiológicos, juntamente com a eficiência nutricional e de crescimento.

CAPÍTULO 1

Crescimento, sobrevivência e discriminação de carbono em clones de eucalipto cultivados no Norte de Minas Gerais

RESUMO: Os plantios de eucalipto realizados no cerrado podem apresentar baixa sobrevivência e crescimento em razão da baixa fertilidade do solo e prolongados períodos de déficit hídrico. O emprego de clones mais tolerantes à seca e de fertilizantes minerais tem sido a estratégia utilizada pelas empresas florestais na tentativa de minimizar os riscos de perdas e aumentar a produtividade florestal. A seleção de genótipos tolerantes à seca é demorada e incerta, pois depende de eventos naturais de seca, e não define os mecanismos responsáveis pela tolerância. Por isso, métodos que permitam a seleção precoce e segura de materiais genéticos de eucalipto quanto à exigência hídrica são necessários. A discriminação isotópica de ^{13}C (Δ) e sua relação com a sobrevivência e crescimento das plantas tem sido sugerida como uma alternativa de seleção de genótipos tolerantes à seca. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer relações entre a Δ , sobrevivência e crescimento de clones de eucalipto e precipitação pluviométrica, na região norte de Minas Gerais, para identificar genótipos melhor adaptados a condições de baixa disponibilidade de água. Árvores de seis clones (i144, i224, i063, i182, 2486 e 3216) foram mensuradas e amostras de folhas e de lenho do tronco coletadas para a determinação da Δ . Foram medidos anualmente o diâmetro e altura e, a partir do quinto ano, o percentual de árvores afetadas (PAA) por estresse hídrico. Os resultados mostraram correlação positiva entre crescimento e precipitação e entre Δ e crescimento, exceto para um dos clones. A correlação entre Δ e PAA foi negativa. A utilização da Δ por si só como indicador da tolerância ao estresse hídrico pode conduzir a interpretações equivocadas, e sua relação com a tolerância à seca por clones de eucalipto precisa ser mais bem entendida.

CHAPTER 1

Growth, survival and carbon discrimination in eucalyptus clones cultivate in the North of Minas Gerais State.

SUMMARY: The eucalyptus plantations conducted in the savanna may have low survival and growth due to low soil fertility and long periods of drought. The use of more drought tolerant clones and mineral fertilizers has been the strategy used by forestry companies in an attempt to minimize the risk of losses and to increase forest productivity. The selection of drought tolerant genotypes by traditional process is lengthy and uncertain because it depends on natural drought events and does not define the mechanisms responsible for tolerance. Therefore, methods that allow faster and safer selection of genetic material regarding water requirement are needed. The ^{13}C isotope discrimination (Δ) and its relation to the survival and growth of plants has been suggested as an alternative to select drought tolerant genotypes. The objective of this study was to establish relationships between Δ , survival and growth of eucalyptus clones and rainfall in the northern region of Minas Gerais, to identify genotypes better adapted to conditions of low water availability. Trees of six clones (i144, i224, i063, i182, 2486 and 3216), were measured and samples of leaves and wood of the trunk collected for the determination of Δ . The diameter and height were measured annually from the fifth year as well as the percentage of affected trees (PAA) by water stress. The results showed a positive correlation between growth and rainfall and between Δ and growth, except for one of the clones. The correlation between Δ and PAA was negative. The use of Δ alone as an indicator of water stress tolerance can lead to misinterpretations, and their relation to drought tolerance in eucalyptus clones need to be better understood.

1 INTRODUÇÃO

Os plantios de eucalipto no Brasil têm sido realizados, predominantemente, na região do cerrado. Em 2011, a área de novos plantios cresceu 1,9 %, mantendo a retomada de crescimento após a crise econômica mundial em 2009 (ABRAF, 2012). A região de cerrado caracteriza-se por solos de baixa fertilidade e prolongados períodos de déficit hídrico. As atuais projeções de mudanças climáticas globais indicam que, assim como a maioria das regiões do mundo, o Brasil também estará vulnerável aos efeitos dessas mudanças (CCST e MOHC, 2011). Mudanças climáticas ao longo prazo têm sido observadas em diversas regiões, onde secas mais longas e intensas têm ocorrido em áreas cada vez maiores desde a década de 1970, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (IPCC/ONU, 2007). Para a região Norte de Minas Gerais, especificamente o município de Montes Claros, a ocorrência de baixos índices pluviométricos tem sido registrada desde 1930, e nesta década foi constatada precipitação anual de apenas 171 mm (INMET, 2012; CODEVASF, 2012; DNOCS, 2012; ICA/UFMG, 2012). Ainda, nos últimos anos, pode-se observar maior frequência de índices pluviométricos abaixo dos 800 mm anuais, valor distante dos aproximados 1000 mm considerados como média anual na região (Apêndice). Este comportamento tem sido previsto em modelagens climáticas avançadas, que fornecem estimativas precisas sobre alterações climáticas futuras, indicando aumento das temperaturas e mudanças no regime de chuvas global (IPCC/ONU, 2007).

Assim, a seleção de materiais genéticos adaptados é condição preponderante para o crescimento florestal e manutenção de altas produtividades, fato que representa uma vantagem competitiva do Brasil em comparação com outros países.

O déficit hídrico é um dos principais limitantes à produtividade do eucalipto, mesmo em áreas consideradas favoráveis ao bom crescimento e desenvolvimento das florestas (Honeysett et al., 1992). Além de reduzir a taxa de crescimento, a baixa disponibilidade hídrica diminui a sobrevivência das árvores resultando em menor produção florestal (Chambers e Borralho, 1997). Em plantios no norte de Minas Gerais, sujeitos a longos períodos de estiagem, observou-se que a sobrevivência de clones comerciais aos sete anos foi drasticamente afetada, ocasionando variações de até 40% no volume final de madeira ao se compararem clones sensíveis com clones tolerantes ao déficit hídrico (Plantar Reflorestamentos, 2011).

Espécies lenhosas ou herbáceas adaptadas a condições com limitação hídrica exibem, geralmente, alta eficiência de utilização de água (EUA) sem penalizações em sua taxa de crescimento (Saranga et al., 1998; Xu et al., 2000). Nessa condição, há

genótipos que permitem abertura parcial dos estômatos, evitando perda excessiva de água ao mesmo tempo em que mantem a concentração interna de CO_2 e, conseqüentemente, a taxa fotossintética - mecanismo que confere maior eficiência de utilização de água (EUA) (Condon et al., 2004). Assim, clones de eucalipto com maior EUA apresentariam menor requerimento de água por unidade de matéria seca produzida. Contudo, em genótipos nos quais a EUA é conseguida principalmente pela baixa condutância estomática, o potencial de fixação de CO_2 pode ser penalizado, afetando o crescimento (Farquhar et al., 1989; Gibson et al., 1994; Osório e Pereira, 1994).

O processo tradicional para a seleção de clones é demorado e incerto, pois depende de eventos naturais de seca, e não define os mecanismos responsáveis pela tolerância. A falta de controle das variáveis ligadas ao clima pode fazer com que os resultados não sejam consistentes. Assim, estudos visando à seleção precoce de materiais genéticos de eucalipto com base em indicadores mais estáveis são de grande relevância.

A EUA é de difícil determinação em condições de campo tendo em vista sua variação temporal e espacial, quando se consideram os vários compartimentos da árvore. Por isso, tentativas de relacioná-la com a discriminação isotópica de ^{13}C (Δ) ou de relacionar Δ com produtividade em condições de déficit hídrico tem sido realizadas (Farquhar et al., 1989). Condon et al., (1987) observaram correlação positiva entre produtividade e Δ para trigo cultivado por dois anos, com períodos de maior pluviosidade que o habitual. Por outro lado, Hubick et al., (1988) encontraram correlação negativa entre matéria seca produzida e Δ em cultivos de amendoim em condições de campo. Da Matta et al., (2003), trabalhando com café conilon, observaram que clones tolerantes apresentaram menor condutância estomática e menor Δ , concomitante à manutenção de maior área foliar e do potencial hídrico da folha. O estabelecimento dessas relações com Δ é de grande importância para o entendimento da fotossíntese e sua relação com o uso da água em estudos ecológicos e fisiológicos de espécies C_3 (Farquhar et al., 1989). No caso de espécies florestais, porções de componentes permanentes, como a madeira, podem ser amostradas e analisadas quanto aos isótopos ^{12}C e ^{13}C e refletir um histórico de maior ou menor disponibilidade de água para crescimento. A relação entre a discriminação entre ^{13}C com disponibilidade de água tem sido avaliada em vários trabalhos com espécies florestais. Cullen et al., (2008) encontraram correlação positiva entre a Δ em discos de madeira de *Callistris columellaris* e intensidade de chuvas na Austrália. Osório e Pereira (1994) verificaram

que a eficiência de uso de água por mudas clonais de eucalipto foi negativamente correlacionada com a Δ .

Por conveniência numérica, Farquhar e Richards (1984) propuseram a utilização da discriminação isotópica como unidade ao invés da composição ou razão isotópica de ^{13}C em plantas. O valor Δ dá indicação direta da grandeza do fracionamento isotópico entre o produto ou dreno (planta) e a fonte ou substrato (C-CO_2 atmosférico) (Trivelin, 2009).

O objetivo deste trabalho foi relacionar a discriminação isotópica de ^{13}C e dados de produtividade de clones de eucalipto com o grau de tolerância ao estresse hídrico, para determinar genótipos melhor adaptados a condições de baixa disponibilidade de água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram coletados em experimento conduzido para avaliar a sobrevivência e o crescimento de clones de eucalipto em diferentes espaçamentos, pela Plantar Reflorestamentos, em Brasília de Minas-MG. O município está localizado na Região Norte do Estado, a 106 e 533 km dos municípios de Montes Claros e Belo Horizonte, respectivamente. A altitude média é de aproximadamente 900 m e precipitação pluvial anual é de aproximadamente 1000 mm (Sistema de controle climatológico COPASA/MG, 2011), concentrados nos meses de novembro a março (Quadro 1).

Quadro 1. Precipitação pluvial (mm) do município de Brasília de Minas-MG no período de 2000 a 2010

ANO	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	TOTALANUAL
2000	123	54	205	0	0	0	0	2	26	43	253	193	899
2001	73	49	61	28	24	0	0	0	0	144	306	153	839
2002	290	215	70	16	0	0	1	0	99	10	176	234	1111
2003	137	18	166	7	10	0	0	7	27	15	34	117	537
2004	99	148	169	95	0	0	4	0	0	38	100	369	1021
2005	128	156	134	8	10	0	0	2	36	61	225	198	958
2006	13	94	390	56	0	0	0	5	50	108	281	193	1189
2007	130	213	37	44	2	0	0	0	0	19	78	87	609
2008	135	108	167	102	0	0	0	0	22	3	244	396	1176
2009	219	82	138	71	11	12	0	1	39	167	59	278	1076
2010	48	66	196	125	34	0	0	0	5	103	223	309	1109

Fonte: Sistema de Controle Climatológico COPASA/MG

O solo é Latossolo Vermelho Amarelo, textura média e o relevo plano (Quadro 2).

Quadro 2. Características químicas e textural do solo na área de experimento em Brasília de Minas/MG

PROFUNDIDADE(0 a 20 cm)							PROFUNDIDADE(0 a 20 cm)		
mg.dm ³		cmolc.dm ³			dag.kg ⁻¹	H ₂ O	dag.kg ⁻¹		
P	K	Ca	Mg	H+Al	M.O.S	pH	AREIA TOTAL	SILTE	ARGILA
0,90	23,15	0,17	0,12	4,28	1,82	4,54	64,64	6,78	28,61

PROFUNDIDADE(20 a 40 cm)							PROFUNDIDADE(20 a 40 cm)		
mg.dm ³		cmolc.dm ³			dag.kg ⁻¹	H ₂ O	dag.kg ⁻¹		
P	K	Ca	Mg	H+Al	M.O.S	pH	AREIA TOTAL	SILTE	ARGILA
0,73	17,85	0,14	0,11	3,72	1,61	4,58	63,44	7,03	29,56

Por ocasião da implantação do experimento, as atividades realizadas para implantação e manutenção foram: Combate a formigas, roçada mecanizada, aplicação 1000 kg de calcário dolomítico em área total, gradagem para incorporação do calcário, subsolagem a 50 cm de profundidade com fosfatagem em filete contínuo utilizando 400 kg de fosfato natural reativo a 20 cm de profundidade, tratamento das mudas com cupinicida e plantio manual, irrigação pós-plantio, adubação de plantio com 100 g/planta de NPK 06-30-06 e 1% de boro, cobre e zinco, adubação de manutenção em duas etapas (4 meses e 12 meses) utilizando 150 kg de KCl em cada etapa e adubação de manutenção com 27 g/planta de borogran 10% realizado em março até o 3º ano após implantação. Atividades como capinas e controle a formigas foram realizadas conforme necessidade.

O experimento foi instalado em dezembro de 2003. Em 2007 ocorreu um longo período de seca, com um volume de chuvas insignificante entre os meses de março a novembro. Nessa oportunidade foram observados fortes sintomas de estresse hídrico nas árvores, havendo clara distinção entre materiais genéticos mais sensíveis ou mais tolerantes à restrição hídrica. Os anos subsequentes mostraram que os clones apresentavam diferentes graus de sensibilidade pela restrição hídrica, com alguns apresentando quase 100% de mortalidade.

O experimento envolveu cinco clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* (i144, i224, i063, i182, e 2486) e um clone híbrido de *Eucalyptus grandis* (3216) estabelecidos no espaçamento de 3 x 3 m (9 m² por planta), em faixas. A escolha desses foi devida sua boa produtividade, características intrínsecas da madeira e disponibilidade em viveiros de propagação clonal. Inventário florestal contínuo, com medição de altura e diâmetro das árvores, foi realizado em três parcelas de 60 plantas para cada clone, entre os anos

de 2005 (1,9 ano de idade) e 2010 (6,8 anos de idade), sendo que após março de 2007 as medições foram realizadas em intervalos de até 6 meses. Relações entre os dados de crescimento, como por exemplo, o incremento corrente anual em diâmetro (ICA) e a precipitação foram calculados pela fórmula:

$$ICA \text{ (cm)} = Da - Dp$$

em que Da = Diâmetro Atual e Dp = Diâmetro do ano anterior.

Também, o crescimento relativo em diâmetro (CRD) entre as medições de inventário foi calculado pela fórmula:

$$CRD \text{ (cm.cm}^{-1}\text{.ano}^{-1}\text{)} = \frac{Da - Dp / Dp}{T}$$

em que T = representa o período (anos) entre as medições de inventário.

A partir de 2009, foram realizadas avaliações qualitativas a cada medição que incluíam a quantidade de árvores afetadas pelo déficit hídrico, caracterizando-as como secas (árvores apresentando copa com folhas totalmente secas ou sem folhas) ou não. A partir desta caracterização, o percentual de árvores afetadas (PAA) foi calculado pelo quociente entre número de árvores secas e número de árvores total nas parcelas, multiplicado por 100. Para melhor estabelecer as relações entre crescimento e precipitação pluvial foi determinado o volume acumulado de chuvas entre cada medição de inventário (Quadro 3).

Em agosto de 2011, quando o experimento completou 7,7 anos, foi realizada a coleta de discos de 2,5 cm de espessura, à altura do DAP (diâmetro a 1,3 m de altura do tronco), de três árvores de diâmetro médio para a determinação da composição isotópica de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) e posteriormente o cálculo da Δ . À exceção do clone 3216, cujas árvores estavam mortas e não possuíam copa, foram coletadas folhas das mesmas árvores conforme a seguir: 1º par de folhas completamente expandidas de galhos apicais, denominadas “Folha Jovem Apical” (FJA); penúltimo par de folhas de galhos apicais, denominadas “Folha Velha Apical” (FVA); 1º par de folhas completamente expandidas de galhos basais, denominadas “Folha Jovem Basal” (FJB); penúltimo par de folhas de galhos basais, denominadas “Folha Velha Basal” (FVB). Esta separação entre folhas coletadas teve o propósito de diferenciar o período de formação das mesmas.

O material vegetal foi levado ao laboratório e secado em estufa com circulação forçada de ar a 72 °C até atingir peso constante. Os discos do tronco tiveram sua superfície lixada, e, para diferenciar os períodos de formação, amostras do lenho foram retiradas a cada 1 cm a partir do centro dos discos. As amostras, tanto de folha como de lenho, foram moídas em moinho de bola e submetidas à determinação da composição de ^{12}C e ^{13}C utilizando-se espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA-GLS, Sercom, Crewe, UK). Em seguida, efetuou-se o cálculo da discriminação isotópica de ^{13}C (Δ). A relação entre os isótopos estáveis de C foi calculada pela fórmula:

$$\delta \text{ (‰)} = \left[\frac{\text{R planta}}{\text{R padrão}} \right] - 1$$

em que R = relação molar do isótopo pesado (^{13}C) e isótopo leve (^{12}C).

$$\Delta \text{ (‰)} = \left[\frac{(\delta^{13}\text{C ar} - \delta^{13}\text{C planta})}{(1 + \delta^{13}\text{C planta}/1000)} \right]$$

Os valores $\delta^{13}\text{C}$ foram expressos em relação ao padrão internacional PDB (PeeDeeBelemnite), conforme descrito por Li et al., (2000).

Os dados foram analisados de acordo com o delineamento inteiramente casualizado. Para cada clone foi calculada a média dos valores da Δ e os respectivos intervalos de confiança em cada amostra de lenho coletada. Foi realizada a análise de variância ($p < 0,10$) da diferença da Δ ao longo dos anos de crescimento para cada clone e também a diferença da Δ entre clones dentro de cada ano de crescimento. O grau de liberdade das interações foi desdobrado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,10$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento dos clones mostrou alta relação positiva com precipitação pluviométrica. O ICA foi a variável mais estreitamente relacionada ($R^2 = 89\%$) com a precipitação (Figura 1). A mesma comparação feita com área basal e volume de chuvas

apresentou, para ambas, coeficiente de 77%, indicando ser a água o fator mais limitante da produtividade florestal na região.

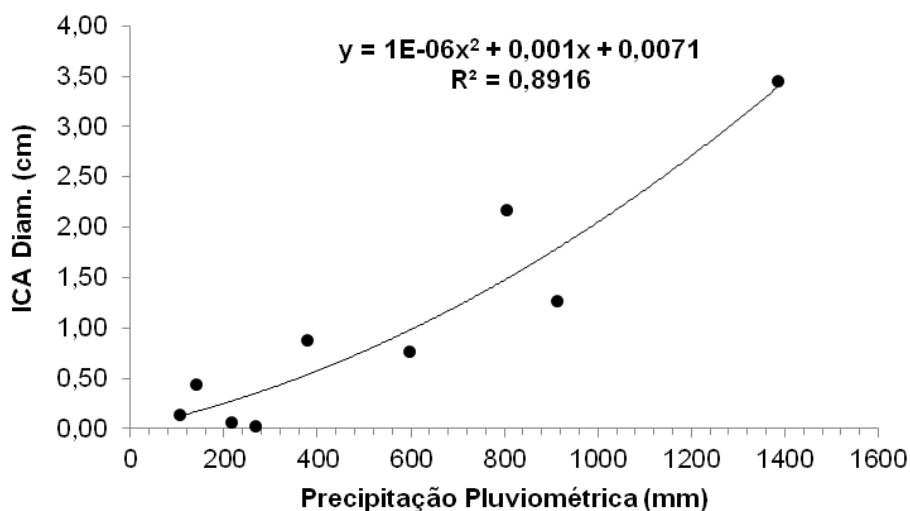


Figura 1. Relação entre Incremento Médio Corrente Anual em diâmetro (ICA) do tronco de clones de eucalipto e precipitação pluviométrica.

Segundo Ferreira e Milani (2002), os efeitos de fatores estressantes, de modo geral, são expressos pela redução da taxa de sobrevivência e de crescimento e da produtividade dos plantios. O crescimento do tronco dos clones foi bastante diferenciado frente ao estresse hídrico, com destaque para o clone i144 por sua maior altura e volume final, sendo maior que o clone 3216, o material mais sensível à seca, em 30,7 % e 169 %, respectivamente (Quadro 3).

Apesar de 2007 ter sido o ano mais seco, com as árvores já expressando sintomas de estresse hídrico, os dados de crescimento relativo anual em diâmetro mostram que esse efeito teve reflexo, ainda que menor, no ano de 2008, indicando que, mesmo com o período de chuvas após o estresse hídrico de 2007, os clones não haviam, ainda, restabelecido seus processos fisiológicos, como por exemplo a não manutenção do turgor nas células que permite a continuidade do crescimento vegetal, expansão, divisão celular e fotossíntese (Petry, 1991) (Figura 2).

Quadro 3. Diâmetro, altura, área basal, volume e sobrevivência de clones de eucalipto, em diferentes idades, e volume de chuvas acumulado no município de Brasília de Minas-MG

CLONE	Med1 (Nov/2005) - 1,9 ANOS					Med2 (Dez/2006) - 3 ANOS					Med3 (Mar/2007) - 3,2 ANOS					Med4 (Nov/2007)–3,9 ANOS				
	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA
i144	8,58	9,65	5,84	28,54	-	11,78	15,20	10,91	77,52	-	12,60	16,43	12,51	95,35	-	13,30	17,47	14,14	118,79	-
2486	7,45	7,82	4,18	17,16	-	10,93	13,10	8,93	55,46	-	11,58	15,08	10,00	70,84	-	12,20	16,72	10,97	85,00	-
i182	7,30	8,38	4,67	20,60	-	10,75	13,60	9,92	64,38	-	11,87	14,95	12,08	84,67	-	12,23	16,60	12,81	99,55	-
i063	7,35	8,33	4,44	19,44	-	10,62	13,58	9,26	59,48	-	11,43	15,75	10,74	79,96	-	11,78	16,30	10,80	83,77	-
i224	7,80	8,35	4,83	20,84	-	11,60	13,92	10,67	68,88	-	12,53	15,95	12,43	91,84	-	12,84	17,24	12,89	105,11	-
3216	6,53	8,18	3,30	14,43	-	9,97	13,37	7,64	48,81	-	10,88	14,82	9,10	64,03	-	11,16	16,18	9,40	75,17	-
Ppt acumulada (mm)	1780					1387					380					143				
CLONE	Med5 (Abr/2008) - 4,4 ANOS					Med6 (Nov/2008) - 5 ANOS					Med7 (Mai/2009) - 5,4 ANOS					Med8 (Out/2009) – 5,8 ANOS				
	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA
i144	14,00	18,80	15,59	135,05	-	14,05	19,78	15,30	142,16	-	15,13	19,37	17,65	169,12	5,30	15,37	20,67	18,20	175,48	4,23
2486	12,95	17,80	12,43	102,34	-	13,00	17,80	12,49	102,34	-	13,87	18,17	14,21	110,45	23,82	13,90	18,65	14,27	110,45	19,63
i182	13,12	18,00	14,76	123,56	-	13,12	18,00	12,62	123,56	-	14,25	18,57	15,37	136,11	21,43	14,25	18,57	14,25	137,05	23,82
i063	12,50	17,43	9,86	100,50	-	12,50	17,43	12,05	100,50	-	14,68	18,02	16,81	108,48	65,48	14,68	18,02	13,76	115,82	64,60
i224	13,50	18,06	14,19	119,04	-	13,50	19,12	13,59	121,51	-	14,74	18,54	17,05	117,53	83,94	14,74	18,54	14,95	121,29	83,94
3216	12,02	17,26	11,08	90,81	-	12,02	17,26	9,85	90,81	-	11,96	17,16	10,82	78,57	98,94	11,96	17,16	9,89	78,57	98,94
Ppt acumulada (mm)	598					268					915					219				
CLONE	Med9 (Mai/2010) - 6,4 ANOS					Med 10 (Out/2010) - 6,8 ANOS														
	DAP	HT	ABA	VOL	PAA	DAP	HT	ABA	VOL	PAA										
i144	16,67	21,90	21,41	213,52	3,20	16,40	22,43	20,73	211,42	4,27										
2486	14,95	21,52	16,46	155,75	10,78	14,97	19,05	16,55	139,83	8,62										
i182	15,37	21,33	17,88	173,09	18,75	15,48	21,23	18,15	178,63	20,53										
i063	16,28	21,02	20,64	151,60	53,58	16,20	19,05	20,46	136,69	50,02										
i224	17,62	20,22	24,37	133,43	83,94	18,12	20,26	25,79	135,77	83,94										
3216	11,96	17,16	13,97	78,57	98,94	11,96	17,16	13,97	78,57	98,94										
Ppt acumulada (mm)	805					108														

DAP – Diâmetro à altura do peito (cm); HT – Altura total (m); ABA – Área basal ($m^2 \cdot ha^{-1}$); VOL – Volume total ($m^3 \cdot ha^{-1}$); PAA – Percentual de mortalidade; PPT acumulada – precipitação acumulada no período entre a medição atual e a anterior (mm)

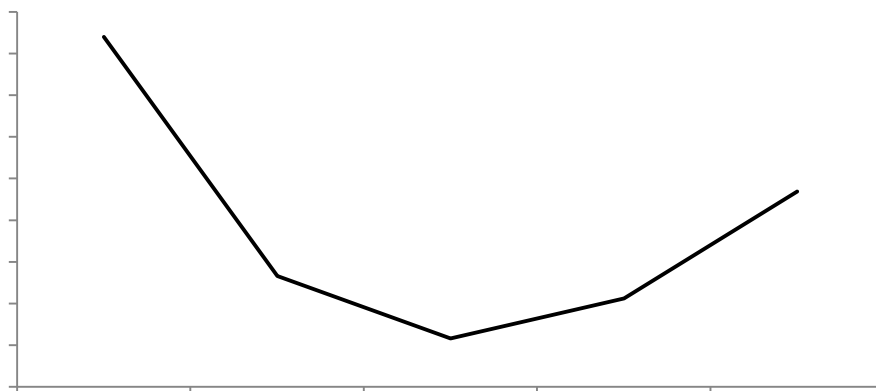


Figura 2. Crescimento relativo médio em diâmetro de clones de eucalipto no período de dezembro de 2005 a outubro de 2010.

Os clones mais sensíveis, como o i224 e 3216 (Figura 3), tiveram um alto PAA, que, a partir dessa época, permaneceu sem alterações nas demais avaliações. O PAA foi de 83,94 % e 98,94 % para os clones i224 e 3216, respectivamente. O crescimento da área basal, após a seca de 2007, foi inexpressivo até a idade de 6,8 anos, o que reflete também a sensibilidade desses clones à seca. Barros e Novais (1990) descrevem que o *E. grandis*, em sua região de origem, está associado a florestas pluviais, não sujeitas ao déficit hídrico. Mesmo na região nordeste da Austrália, essa espécie ocorre em locais de altitude mais elevada, com temperaturas mais baixas, precipitação total ainda elevada e com estação de seca pouco prolongada. Estas condições se contrastam bastante com as que são encontradas na região norte de Minas Gerais, o que é coerente com a inaptidão de materiais da espécie *E. grandis*, como o clone 3216.



Figura 3. Parcela do clone 3216 com 98,94 % de mortalidade de árvores.

Igualmente aos clones i224 e 3216, os clones 2486 e i063 foram fortemente afetados pelo déficit hídrico, sendo o i063 o primeiro material a expressar sintomas de estresse no campo. Apesar disto, houve uma recuperação desses materiais genéticos, refletida na diferença do PAA entre a primeira e última avaliação. Essa recuperação ocorreu com a recomposição da copa de parte das árvores das parcelas. Mesmo com essa recuperação, os materiais apresentaram baixa produtividade, ainda menor que o clone i182, que apesar de apresentar aos 6,8 anos um PAA de 20,53%, obteve área basal maior que o clone 2486 cujo PAA foi de 8,62% (Quadro 3).

O clone i144 foi o que apresentou o melhor desempenho. Além de um percentual baixo de árvores afetadas (4,27%), o crescimento volumétrico não foi tão prejudicado pelo déficit hídrico, podendo assim ser classificado como material tolerante à seca, o que justifica sua escolha para plantios em regiões com restrição hídrica.

O crescimento das árvores, a precipitação pluviométrica e a Δ se correlacionaram significativamente (Figuras 4 e 5). O incremento corrente anual em diâmetro dos clones teve alta correlação positiva ($r = 0,93$; $p = 0,0003$) com a precipitação anual. Já a Δ dos clones se correlacionou de forma diferenciada com o crescimento e precipitação. Para os clones i144, 2486, i063, i182 e i224 a correlação da Δ foi positiva com o incremento corrente anual em diâmetro e precipitação, e o coeficiente de relação foi igual para ambos ($r = 0,92$). Resultados semelhantes foram obtidos por Cullen et al. (2008), que obtiveram alta correlação entre Δ e precipitação

para *Callitrisco lumellaris*, espécie arbórea encontrada no noroeste da Austrália, e por Pita et al. (2001) para *E. globulus* na Espanha. Comportamento contrastante com os demais foi apresentado pelo clone 3216, cujas correlações foram negativas ($r = -0,98$ e $-0,99$) entre Δ e o incremento corrente anual e precipitação, respectivamente. Segundo Pita et al. (2001), valores de Δ são negativamente relacionados com a produtividade quando a variação em discriminação é resultado de mudanças na eficiência de carboxilação. Em contraste, se a variação na Δ está relacionada principalmente à variação da condutância estomática, então os valores Δ devem ser positivamente correlacionados com o crescimento.

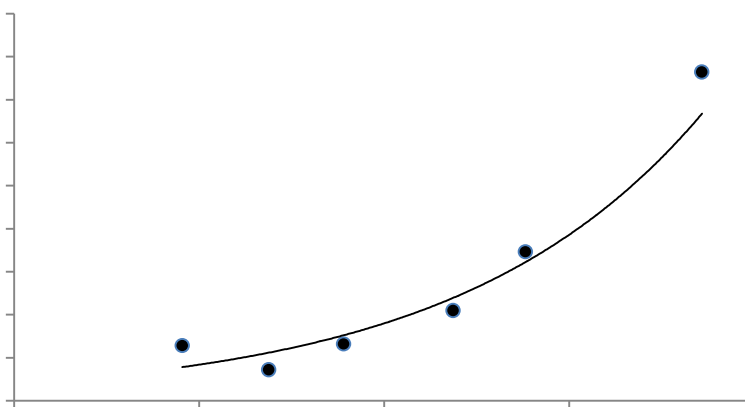


Figura 4. Incremento corrente anual em diâmetro (cm) de clones de eucalipto e sua relação com a discriminação isotópica de ^{13}C (Δ ‰).

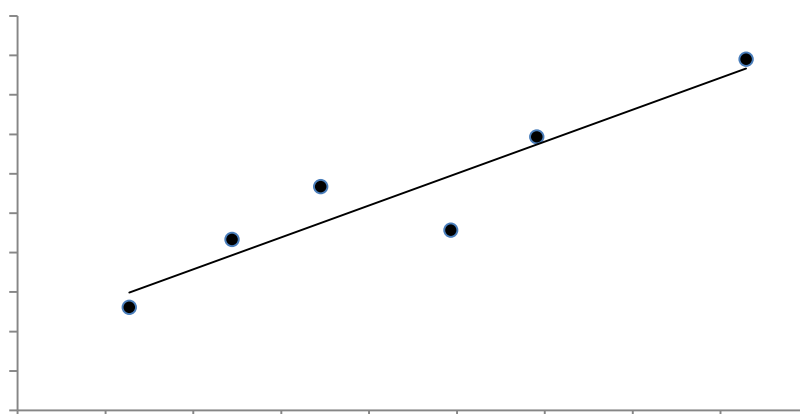


Figura 5. Precipitação pluviométrica (mm) e sua relação com a discriminação isotópica de ^{13}C (Δ ‰).

Conforme mencionado, o percentual de árvores afetadas (PAA) é um indicador de grande relevância, visto que por meio dele podem-se comparar e classificar diversos materiais genéticos quanto ao grau de tolerância ao estresse hídrico. A possibilidade de

se correlacionar esta característica com propriedades ou indicadores precocemente determináveis pode ser importante ferramenta na seleção de materiais tolerantes à seca. Desta forma, buscou-se estabelecer correlações entre a Δ do lenho nos primeiros anos de crescimento e o PAA da última medição de campo, que representa o dado mais próximo ao percentual de mortalidade de árvores. Utilizando o inventário florestal contínuo, considerou-se o diâmetro de cada clone na primeira medição, realizada quando as plantas tinham dois anos de idade. Posteriormente, foram calculadas as médias da Δ do lenho referente a este período para cada clone, sendo estes dados correlacionados com o PAA. O coeficiente de correlação foi de -0,73 ($p < 0,10$). Estes resultados se assemelham aos encontrados por Pita et al. (2001), pelos quais a mortalidade apresentou correlação altamente significativa ($r = -0,95$) com a Δ .

Vários autores (Farquhar et al., 1982; Gibson et al., 1994; Osório e Pereira, 1994; Liu et al., 1996; Cullen et al., 2008) relatam que em condições de estresse climático, há um comprometimento do processo fotossintético, o que altera o balanço de C de todo metabolismo da planta. Em plantas C3, em uma primeira etapa, a Δ é decorrente da menor taxa de difusão do ^{13}C , mais pesado que o ^{12}C , causando discriminação de aproximadamente 4,4 ‰. Em uma segunda etapa ocorre a discriminação devido a menor afinidade da rubisco pelo ^{13}C , tendo, assim, uma discriminação final de aproximadamente 28 ‰ (Gutschick, 2004; Taiz e Zeiger, 2013). Porém, em condições em que a concentração interna de CO_2 é reduzida, pela menor abertura dos estômatos e a taxa fotossintética é mantida, há menor discriminação do ^{13}C em comparação ao ^{12}C pela rubisco, reduzindo a Δ . Este mesmo comportamento foi observado para os clones estudados, à exceção do clone 3216. Próximo ao quarto ano de crescimento das árvores, que coincidiu com o evento de déficit hídrico prolongado, há uma tendência de quatro dos seis clones discriminarem menos o ^{13}C (Figura 6).

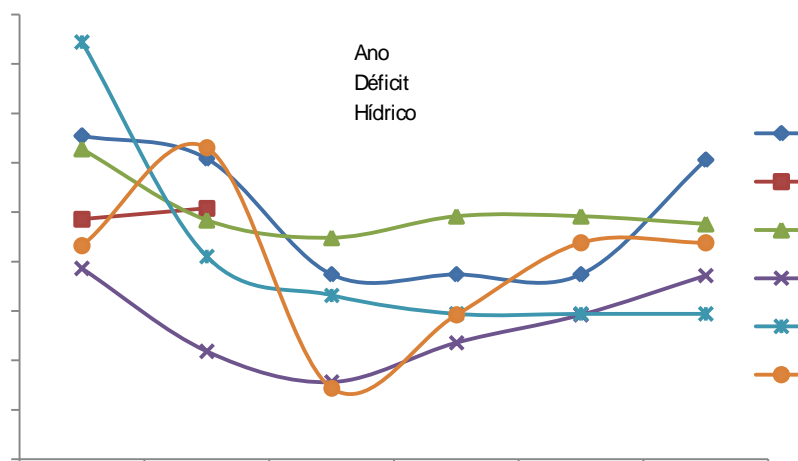


Figura 6. Discriminação Isotópica de ^{13}C de lenho em clones de eucalipto ao longo de sete anos de crescimento.

O resultado da análise de variância mostrou diferenças significativas ($p < 0,10$) de Δ entre clones e, também, para o tempo dentro de cada clone. As médias de Δ dos genótipos variaram de 17,72 ‰ a 21,22 ‰, sendo que o menor valor de Δ foi observado para o clone i182 e o maior para o clone i063.

No sentido de desdobrar as diferenças encontradas foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,10$) (Quadro 4). Os resultados mostram que apenas os clones i063 e i182 apresentaram diferenças na Δ ao longo do tempo, sendo os demais estáveis. A variação na Δ do primeiro clone foi de 18,47 ‰ a 21,22 ‰ e do segundo 17,72 ‰ a 20,15 ‰. Para o i063, a Δ foi máxima até os dois anos de idade, diferindo-se dos demais anos. Já para o i182 observa-se que a Δ do terceiro ano difere da Δ do quarto e quinto anos. Neste último período, os valores de discriminação foram os mais baixos, comportamento que coincide com o estresse hídrico prolongado no quarto ano, com possível comprometimento de processos metabólicos das árvores no ano seguinte. Segundo Flexas e Medrano (2002) durante um período de seca os processos metabólicos vão sendo progressivamente inibidos até que a deficiência metabólica torna-se o grande limitante da fotossíntese, com reflexos sobre a Δ . Sobre a variação na Δ ao longo dos anos, Leavitt e Long (1991) descrevem que ela geralmente é atribuída à disponibilidade de água no solo e ao déficit de pressão de vapor associada a alterações de crescimento das árvores, fechamento do dossel e nível de competição entre plantas. Esta explicação se alinha com o observado neste trabalho, no qual, na ocasião do déficit hídrico prolongado no norte de Minas Gerais, os efeitos do estresse hídrico nas árvores ocorreu

em plantios com idades iguais ou superiores a três anos (Plantar Reflorestamentos, 2007). O padrão na alteração da Δ ocorrida do terceiro para o quarto ano do clone i182 deve-se, provavelmente, à limitação da condutância estomática. Em 2006 a precipitação anual foi superior à média normal anual em 232 mm. Sob condições de maior disponibilidade de água, as plantas tendem a permanecer com os estômatos abertos por mais tempo, maximizando a entrada de CO_2 , havendo assim uma maior discriminação do ^{13}C em relação ao ^{12}C , conforme já discutido, fazendo com que o clone atingisse seu maior valor de Δ . No ano seguinte, a precipitação anual foi inferior à média em 347 mm. Em condições de forte estresse hídrico os estômatos tendem a permanecer fechados por mais tempo, reduzindo a entrada de CO_2 . Com a menor disponibilidade interna de C, as plantas tendem a discriminar menos o ^{13}C , fazendo com que o clone atingisse o menor valor de Δ . Os resultados encontrados neste trabalho se assemelham aos obtidos por Rasheed et al. (2011) que, estudando nove genótipos de álamo ao longo de 10 anos de crescimento no sudoeste da França, constataram variações de Δ no lenho apenas em dois anos.

Quadro 4. Discriminação isotópica de ^{13}C (Δ) em amostras de lenho de clones de eucalipto ao longo de sete anos de crescimento, no Município de Brasília de Minas, MG

CLONE	Δ ‰					
	2 ANOS	3 ANOS	4 ANOS	5 ANOS	6 ANOS	7 ANOS
i224	18,93 Ad	18,09 Ab	17,78 Abc	18,18 Ab	18,46 Aa	18,86 Aa
i182	19,16 Acd	20,15 Aa	17,72 Bc	18,46 B ab	19,19 ABa	19,19ABa
3216	19,43 Abcd	19,54 Aab	-	-	-	-
i144	20,14 Abc	19,42 Aab	19,24 Aa	19,46 Aa	19,46 Aa	19,38 Aa
2486	20,27 Aab	20,04 Aa	18,87 Aab	18,87 Aab	18,87 Aa	20,03 Aa
i063	21,22 Aa	19,05 Bab	18,66 Babc	18,47 Bab	18,47 Ba	18,47 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (comparando o efeito do tempo) dentro de cada clone, e, pela mesma letra minúscula (comparando o efeito dos clones) dentro de cada ano de crescimento, não diferem entre si pelo teste de t ($p > 0,10$).

Em relação à diferença de Δ entre clones, o teste de Tukey ($p < 0,10$) mostrou que ela existe até o quinto ano (Quadro 4). O comportamento entre clones ano a ano mostra-se diferenciado, onde se destaca, à exceção do terceiro ano, uma diferença consistente em Δ entre os clones i144, caracterizado como mais tolerante neste estudo, e i224, o segundo clone de pior comportamento no que diz respeito ao PAA. Este resultado poderia ser um forte indicador de que a Δ poderia sim ser utilizada para diferenciar clones sensíveis e tolerantes ao estresse hídrico. Entretanto, foi observada

maior média de Δ do clone i144 em relação ao i224, o que significaria uma maior transpiração e perda de água pelo clone i144. Em condições onde a água é limitante, isto poderia acarretar maior mortalidade, que não foi o caso observado neste experimento. Isso sugere que o clone i144 apresentaria outras estratégias, tais como ajustamento osmótico e/ou aprofundamento radicular, para suplantar os efeitos da seca e manter seus estômatos abertos por mais tempo. Em seu estudo com *Eucalyptus globulus*, em diferentes regiões climáticas, Pita et al. (2001) mostraram haver diferenças de Δ entre genótipos e relação positiva entre Δ e sobrevivência, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Entretanto, para uma das regiões estudadas por Pita et al. (2001) houve alto índice de mortalidade ligada a um menor valor de Δ . Os autores concluem que a utilização da Δ pode não ser um bom indicador de sobrevivência em ambientes propensos à seca. Além disso, a eficiência transpiratória deve ser considerada como apenas uma de muitas características que conferem a capacidade de sobrevivência de materiais em ambientes com limitação hídrica (Hubick e Gibson, 1993). Nesta linha, Cullen et al. (2008) sugerem a utilização da $\delta^{13}\text{C}$ relacionada à composição isotópica de ^{18}O ($\delta^{18}\text{O}$), visto que há dependência da $\delta^{13}\text{C}$ da relação Ci/Ca, e esta apresenta informação limitada da força do controle estomático sobre o Ci e a fotossíntese, porque uma mudança na Ci poderia ser resultado de uma alteração da condutância estomática ou da fotossíntese. A diferença entre os clones i144 e i224 deixa de existir nos últimos dois anos devido a maior Δ deste último, que, possivelmente, após o estresse sofrido, apresentou recuperação de seus processos metabólicos.

A análise de variância para a Δ de folhas mostrou haver diferença ($p < 0,10$) desta variável para clone e tipo de folha (FJA, FVA, FJB, FVB), mas não para a interação clone x tipo de folha. Para desdobrar as diferenças encontradas foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,10$) (Quadro 5). Observa-se que o clone 2486 diferiu-se dos demais clones apresentando a maior Δ .

A correlação entre a média de Δ de folhas e a Δ média de lenho foi altamente significativa ($r = 0,93$; $p < 0,025$) (Figura 7). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Macfarlane et al. (2004) e Nunes (2010) que descrevem haver boa correlação entre os resultados de Δ entre lenho e folhas, o que possibilita a utilização deste último como método mais simples para a determinação da Δ do lenho.

Quadro 5. Discriminação isotópica de ^{13}C (Δ) média em folhas (média dos tipos de folhas) e em amostras individuais de folhas Folha Jovem Apical (FJA), Folha Velha Apical (FVA), Folha Jovem Basal (FJB) e Folha Velha Basal (FVB) de clones de eucalipto no Município de Brasília de Minas, MG

CLONE	Δ ‰	TIPO DE FOLHA	Δ ‰
2486	23,68 A	FJB	22,85 a
i144	22,08 B	FVB	22,63 ab
i182	21,48 B	FVA	21,65 b
i063	21,82 B	FJA	21,09 b
i224	21,21 B		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula comparando o efeito do clone, e, pela mesma letra minúscula comparando o efeito da posição da folha no galho, não diferem entre si pelo teste de $t(p > 0,10)$.

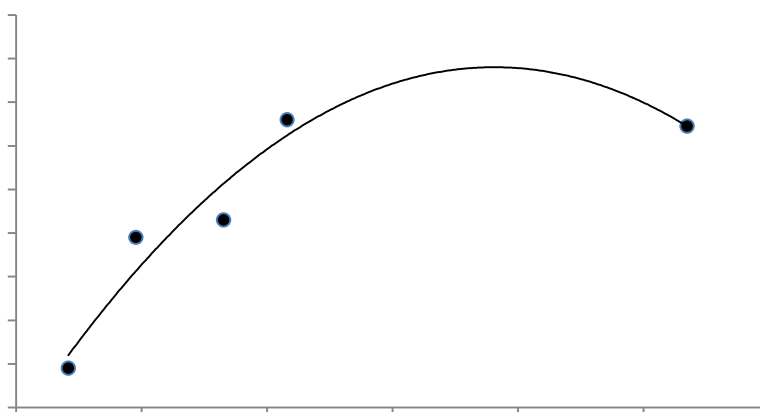


Figura 7. Relação entre a discriminação isotópica de ^{13}C de lenho e de folhas em clones de eucalipto no norte de Minas Gerais.

4 CONCLUSÕES

- Foram identificadas relações altamente positivas entre as variáveis de crescimento (diâmetro, volume e área basal) dos clones e precipitação pluviométrica, o que evidencia a água como fator muito limitante à produtividade florestal na região.
- O percentual de árvores afetadas pela seca (PAA) é um bom indicador de tolerância ao estresse hídrico e pode ser relacionado com outras características mensuráveis para a separação de materiais sensíveis e tolerantes à seca.
- Considerando o PAA, os clones estudados podem ser elencados em $3216 > i224 > i063 > i182 > 2486 > i144$, sendo o 3216 foi o clone mais sensível ao déficit hídrico e o clone i144 o mais tolerante.
- A Δ do lenho de clones se correlacionou positivamente com o crescimento e precipitação, para os clones i144, 2486, i063, i182 e i224 e negativamente para o 3216.
- Os resultados mostram haver correlação negativa entre a Δ de lenho referente aos dois primeiros anos de crescimento e o percentual de mortalidade. A utilização da Δ por si só como indicador a tolerância ao estresse hídrico pode conduzir a interpretações equivocadas. A determinação da $\delta^{18}\text{O}$ no lenho ou folhas de plantas juntamente à determinação da $\delta^{13}\text{C}$ e, conseqüentemente, da Δ , pode auxiliar na separação de materiais genéticos quanto à tolerância à seca.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF - Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011. 150p; 2012.
- BARROS, N. F. e NOVAIS, R. F. Relação Solo-Eucalipto. Editora Folha de Viçosa, 330 p., 1990.
- CCST e MOHC. Riscos de mudanças climáticas no Brasil - Análise conjunta Brasil-Reino Unido sobre os impactos das mudanças climáticas e do desmatamento da Amazônia. INPE, Cachoeira Paulista. 2011. 55 p.
- CHAMBERS, P.G.S. e BORRALHO, N.M.G. Importance of survival in short-rotation tree breeding programs. *Can. J. For. Res.*, 27:911-917, 1997.
- CODEVASF, 2012. Dados Meteorológicos da Estação de Montes Claros.
- CONDON, A.G.; RICHARDS, R.A. e FARQUHAR, G.D. Carbon isotope discrimination is positively correlated with grain yield and dry matter production in field-grown wheat. *Crop Sci.*, 27:996–1001, 1987.
- CONDON, A.G.; RICHARDS, R.A.; REBETZKE, G.J. e FARQUHAR, G.D. Breeding for high water use efficiency. *J. Exp. Bot.*, 55:2447-2460, 2010.
- COPASA, 2010. Dados de precipitação anual da estação de tratamento de Brasília de Minas-MG.
- CULLEN, L.E.; ADAMS, M.A.; ANDERSON, M.J. e GRIERSON, P.F. Analyses of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in tree rings of *Callitris columellaris* provide evidence of a change in stomatal control of photosynthesis in response to regional changes in climate. *Tree Physiol.*, 28, 1525–1533, 2008.
- DA MATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUACTTI, C. e LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci.*, 164:111-117, 2003.
- DNOCS, 2012. Dados Meteorológicos da Estação de Montes Claros.
- FARQUHAR, G.D.; O'LEARY, M.H. e BERRY J.A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.*, 9: 121-137, 1982.
- FARQUHAR, G. D. e RICHARDS, R. A. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.*, 11:539-52, 1984.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R. e HUBICK, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 40:503-537, 1989.
- FERREIRA, F.A. e MILANI, D. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu: International Paper, 98 p, 2002.

- FLEXAS, J. e MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C-3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.*, 89:183–189, 2002.
- GIBSON, A.; BACHELARD, E.P. e HUBICK, K.T. Growth strategies of *Eucalyptus camaldulensis* at three sites in northern Australia. *Austr. J. Plant Physiol.*, 21:653–662, 1994.
- GUTSCHICK, V.P. Carbon isotope abundance and discrimination in plant studies: an idiosyncratic explanation of how discrimination works, and how it illuminates plant performance, and some novel simple formulae for plant responses to the environment. *For. Biol.*, 17p, 2004.
- HONEYSETT, J.L.; BEADLE, C.L. e TURNBULL, C.R.A. Evapotranspiration and growth of two contrasting species of eucalyptus under non-limiting water availability. *For. Ecol. Manage.*, 50:203-216, 1992.
- HUBICK, K.T.; WRIGHT, G.C. e FARQUHAR, G.D. Discrimination in Carbon Isotopes of Leaves Correlates With Water-Use Efficiency of Field-Grown Peanut Cultivars. *Austr. J. Plant Physiol.*, 15(6) 815 – 825, 1988.
- HUBICK, K.T. e GIBSON, A. Diversity in the relationship between carbon isotope discrimination and transpiration efficiency when water is limited. In: *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. Academic Press, San Diego. 1993. p. 311-325.
- ICA/UFMG, 2012. Dados Metereológicos da Estação de Montes Claros.
- INMET, 2012. Dados Metereológicos da Estação de Montes Claros.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE e UNITED NATIONS. *Climate Change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 996 p, 2007.
- LEAVITT, S.W. e LONG, A. Seasonal stable-carbon isotope variability in tree-rings: possible paleoenvironmental signals. *Chem. Geol.*, 87:59–70.1991.
- LI, C.; BERNINGER, F.; KOSKELA, J. e SONNINEN, E. Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27:231-238, 2000.
- LI, C. Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiol. Plant.*, 108:134-139, 2000.
- LIU, Y.; WU X.; LEAVITT S.W. e HUGHES, M.K. Stable carbon isotope in tree-rings from Huangling, China and climate variation. *Science*, 26 (2): 152–161, 1996.
- NUNES, F.N. Crescimento e expressão gênica em clones de eucalipto influenciados pelo boro e déficit hídrico. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2010. 65f. Tese (Doutorado)

MACFARLANE, C., ADAMS, M.A. e WHITE, D.A. Productivity, carbon isotope discrimination and leaf traits of trees of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to water availability. *Plant Cell and Environment*, 27: 1515-1524, 2004.

OSORIO, J. e PEREIRA, J.S. Genotypic differences in water use efficiency and ^{13}C discrimination in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.*, 14, 871-882, 1994.

PITA, P.; SORIA, F.; CANAS, I.; TOVAL, G. e PARDOS, J.A. Carbon isotope discrimination and its relationship to drought resistance under field conditions in genotypes of *Eucalyptus globulus* Labill.. *For. Eco. Manage.*, 141:211-221, 2001.

PLANTAR REFLORESTAMENTOS. Relatório anual, 2007.

PLANTAR REFLORESTAMENTOS. Relatório anual, 2011.

RASHEED, F.; RICHARD, B.; THIEC, D.; MONTPIED, P.; PAILLISSA, E.; BRIGNOLAS, F. e DREYER, E. Time course of $\delta^{13}\text{C}$ in poplar wood: genotype ranking remains stable over the life cycle in plantations despite some differences between cellulose and bulk wood. *Tree Physiol.* 31: 1183-1193. 2011.

SARANGA, Y.; FLASH, I. e YAKIR, D. Variation in water-use efficiency and its relation to carbon isotope ratio in cotton. *Crop Sci.*, 38: 782–787. 1998.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5aed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TRIVELIN, P. C. O. Fracionamento dos isótopos estáveis de carbono na fixação do CO_2 atmosférico por plantas C3, C4 e CAM: Aplicações. Material didático do curso de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba. 2009.

XU, W.W.; SUBUDHI, P.K.; CRASTA, O.R.; ROSENOW, D.T.; MULLET, J.E. e NGUYEN, H.T. Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Genome*, 43: 461–469, 2000.

CAPÍTULO 2

Produção de matéria seca e trocas gasosas de clones de eucalipto influenciadas pelo cálcio e boro em diferentes condições hídricas

RESUMO: A expansão da eucaliptocultura no Brasil tem ocorrido principalmente em áreas de cerrado, que possuem solos de baixa fertilidade e apresentam déficit hídrico prolongado. Sob estas condições, as plantas apresentam normalmente sintomas de seca de ponteiros, usualmente atribuída à deficiência de boro (B). A depender da intensidade do déficit hídrico, esses sintomas podem evoluir para a dessecação e morte das plantas. Estudos da demanda nutricional associados aos efeitos do estresse hídrico têm mostrado a importância do boro, em especial, na mitigação desses efeitos. Assim como para o B, deficiência de Ca tem sido relacionada a alterações fisiológicas das plantas, dentre elas a integridade da membrana plasmática e síntese e estrutura da parede celular. Em campo, os sintomas desses dois nutrientes podem muitas vezes ser confundidos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência do Ca e do B na tolerância de clones de eucalipto à deficiência hídrica. Em casa de vegetação dois clones, um sensível (i042) e outro tolerante (i144) à restrição hídrica, foram cultivados em solução de Clark modificada até completarem 14 dias. Após esse período, as mudas foram submetidas à presença ou ausência de Ca e, ou, B até completarem 14 dias. Aos 30 dias, foi imposta restrição hídrica gradativa com PEG 6000, em 50 % dos vasos, reduzindo o potencial hídrico paulatinamente, passando por -0,16 e -0,65 até atingir -1,00 MPa. O intervalo de tempo entre esses potenciais foi de sete dias, totalizando 21 dias de estresse. Na ocasião da aplicação de PEG foram determinadas matéria seca e trocas gasosas das plantas. Avaliaram-se a taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência do uso da água (A/E), teores de Ca e B e matéria seca dos vários órgãos das mudas. Foram observadas diferenças entre os dois clones estudados em matéria seca total e trocas gasosas, sendo estas diferenças dependentes do estresse hídrico e da nutrição de Ca e B. No clone sensível, o B se mostrou mais importante na mitigação do estresse hídrico ao passo que no clone tolerante o Ca foi relativamente mais importante que o B, o que pode estar ligado ao papel do Ca na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

CHAPTER 2

Dry matter production and gas exchange of eucalyptus clones influenced by calcium and boron in different water conditions

SUMMARY: The expansion of eucalyptus plantations in Brazil has occurred mainly in areas of savanna soils that have low fertility and extended drought. Under these conditions the plants usually have symptoms of die back, usually attributed to a boron (B) deficiency. Depending on the drought intensity, these symptoms may progress to desiccation and plants death. Studies of nutrient demand associated with the effects of water stress have shown the importance of B, especially in mitigating these effects. As for B, calcium (Ca) deficiency has been linked to plants physiological changes, including the integrity of the plasma membrane and synthesis and cell wall structure. In the countryside, the symptoms of these two nutrients can often be confused. The objective of this study was to investigate the influence of Ca and B tolerance of eucalypt clones to water stress, from the physiological parameters such as the rate of net photosynthetic assimilation (A), stomatal conductance (gs) , transpiration rate (E), internal CO₂ concentration (Ci) together with the nutritional efficiency and growth. In the greenhouse two clones, a susceptible (i042) and other tolerant (i144) to water restriction were cultivated in Clark solution modified for 14 days. After this period, the seedlings were treated with presence or absence of Ca and or B for 14 days. Approximate 30 days, gradual water restriction was imposed with PEG 6000, in 50 % of vases, reducing the water potential from - 0.16 to -1.00 MPa (-0.16 , -0.65 and -1.00 MPa) every seven days. At the time of application of PEG were determined dry matter and gas exchange of plants. Differences were observed between the two clones studied in the total gas exchange and dry matter, and these differences are dependent on water stress and nutrition Ca and B. In the susceptible clone, B was more important in the mitigation of water stress, while in the tolerant clone, Ca was relatively more important than B, which may be related to the Ca function activity in the enzymes related with oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

Em condições tropicais, o suprimento de água e nutrientes é o principal determinante da produção florestal (Barros e Comerford, 2002). Modelos climáticos indicam um cenário de aumento das temperaturas e mudanças no regime de chuvas (IPCC/ONU, 2007), situação já observada nos últimos anos, a partir de 2012. Além disso, a utilização cada vez maior de áreas que já apresentam condições climáticas desfavoráveis, com baixa ou má distribuição de chuvas, e ainda, solos com baixas fertilidade e capacidade de retenção de água para o cultivo de eucalipto, tem orientado pesquisas no Brasil na busca de materiais tolerantes a essas condições restritivas. No início da década de 2000 essa busca fundamentou-se basicamente na seleção de clones com maior adaptabilidade e consequente maior produtividade em testes estabelecidos em áreas com histórico de restrição hídrica. Esta estratégia não contribui para o entendimento dos mecanismos fisiológicos ou características genéticas que levam um determinado clone a suportar tais condições. Este conhecimento, aliado ao entendimento da demanda nutricional da planta, é fundamental para dar suporte ao avanço de uma nova técnica que possa prever o comportamento de novos materiais em áreas marginais sem que haja dispêndio de um longo período de tempo.

No período de seca a absorção de nutrientes pelas plantas fica comprometida devido ao menor fluxo transpiratório. Um dos principais sintomas observados nessa condição é a seca de ponteiros que, em condições extremas, tem como resultado a morte de meristemas e a perda de dominância apical (Dell e Malajczuk, 1994). Este sintoma é usualmente associado à deficiência de boro (B) e sua intensidade e os distúrbios observados são diferentes entre materiais genéticos, o que é indicativo de tolerância diferencial à seca (Nunes, 2010; Reis, 2011). Mattiello et al. (2009) relataram que a deficiência de B causou redução de 21,2%, em média, no peso de matéria seca da parte aérea em mudas de eucalipto. Também em experimento conduzido em casa de vegetação, Reis (2011) obteve como resultado uma redução significativa de matéria seca quando um clone de eucalipto considerado como tolerante ao estresse hídrico foi submetido à ausência de B e condições de restrição hídrica. Segundo Parr e Loungman (1983), são várias as alterações fisiológicas induzidas pela deficiência de B nas plantas, dentre elas a perda da integridade da membrana plasmática, a síntese e estrutura da parede celular, lignificação, o transporte de açúcares, metabolismo de carboidratos e de

ácido indol acético. Estes mesmos autores atribuem algumas dessas alterações, como integridade da membrana plasmática, estrutura da parede celular e lignificação, ao Ca.

Nos últimos anos, estudos de fisiologia vegetal e biologia molecular têm dado foco especial ao Ca, visto o seu papel como mensageiro secundário, o qual relaciona respostas fisiológicas a estímulos ambientais e de desenvolvimento (Marschner, 2012). Esses estudos salientam a importância do Ca na tolerância de plantas ao estresse hídrico. Abdel-Basset (1998) identificou que a suplementação de Ca em plantas de *Vicia faba* aumentou o conteúdo de água nos tecidos, reduzindo os efeitos do estresse hídrico. Vários autores (Nur e tal., 1986; Cooke et al., 1986; Abdel-Basset e Issa, 1994) reportam que o Ca regula uma variedade de processos fisiológicos em plantas com estresse, combatendo estes efeitos. Muitos desses processos estão ligados à estabilização da membrana celular. Outro tipo de abordagem é feito por Li et al. (2003), que em seu trabalho com alcaçuz (leguminosa), demonstraram a importância do Ca na diminuição dos efeitos causados pelo estresse oxidativo em células, em razão da menor disponibilidade hídrica.

A interação entre Ca e B é observada em estudos de campo desde a década de 70 (Teasdale e Richards, 1990), e foi amplamente discutida por Bollaños et al. (2004). Gupta (1979), em seu trabalho de campo com cevada, relatou interações negativas entre os dois nutrientes, onde em condições de solos com altas concentrações de Ca haveria indução da deficiência de B. Gupta e Macleod (1981) determinaram que a concentração de B em plantas de cevada e ervilha estaria relacionada ao pH do solo e não aos teores de Ca. Bonilla et al. (2004) relataram que sementes de ervilha submetidas a estresse salino, na concentração de 75 mM de NaCl, tiveram os efeitos danosos mitigados com a aplicação de B ou Ca, mas o alongamento radicular e o desenvolvimento das plantas somente foi aumentada na aplicação de ambos. Evidências sugerem que o Ca possui ação de estabilização dos complexos de boro na parede celular (Bollaños et al., 2004). Kobayashi et al. (1999) identificaram que a formação de borato - dimérica - ramnogalacturonano II (B- RG - II) (polissacarídeo péctico) in vitro foi estimulada pelo Ca e que, na sua presença, o complexo formado foi mais estável do que sem Ca. Tem sido proposto que o mesmo mecanismo pode ser aplicado aos complexos de B na membrana celular (Wimmer e Goldbach, 1999).

O objetivo deste estudo foi verificar a influência do Ca e B na tolerância de dois clones de eucalipto à deficiência hídrica, a partir de parâmetros fisiológicos e nutricionais e de produção de matéria seca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento das plantas e aplicação dos tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em sistema hidropônico. Mudanças de dois clones de *Eucalyptus urophylla*, caracterizados como tolerante (clone i144) e sensível (clone i042) à seca por Nunes (2010), foram obtidas em viveiro de produção de mudas da Empresa Plantar Reflorestamento. As mudas foram produzidas pelo processo de miniestaquia. Miniestacas de ápice foram estaqueadas em tubetes contendo mistura de 50 % de vermiculita, 40% de casca de arroz carbonizada e 10% de fibra de coco, previamente adubada com 5 kg de Super Simples e 3 kg de osmocote por m³ de mistura. Após estaqueamento, as miniestacas permaneceram por 20 dias em casa de vegetação com condições de umidade e temperatura controladas até o seu enraizamento, de onde seguiram para casa de sombra, local com condições controladas de luminosidade, permanecendo por 15 dias. Completados 35 dias, as mudas seguiram para área de crescimento a pleno sol, recebendo diariamente fertirrigações com solução nutritiva (Quadro 1).

Quadro 1. Composição da solução de fertirrigação de mudas em viveiro clonal

FERTILIZANTE	g.1000 L⁻¹
Nitrato de Cálcio	33.300,00
Sulfato de Amônio	13.300,00
Ácido Fosfórico	3.300,00
Cloreto de Potássio	11.100,00
Sulfato de Magnésio	14.400,00
Ácido Bórico	1.222,20
Sulfato de Zinco	122,20
Sulfato de Cobre	166,00
Sulfato Ferroso	3.222,00
EDTA Dissódico	4.666,00
Sulfato de Manganês	667,00
Molibdato de Sódio	33,30

Completados 60 dias, mudas com 20 cm de altura, diâmetro de coleto de aproximadamente 2 mm e com pelo menos 3 pares de folhas completamente expandidas foram selecionadas para a montagem do experimento. Suas raízes foram lavadas em água deionizada para remover o substrato aderido a elas e em seguida as mudas seguiram para aclimação em vasos de 8 L com solução nutritiva de Clark (1975), adaptada por Locatelli et al. (1984) (Quadro 2), de modo a suprir 50 % do N como

NH₄⁺ e 50 % como NO₃⁻, cuja concentração de nutrientes foi aumentada gradativamente até atingir os valores normais ao final de 14 dias. Cada vaso continha três plantas.

Quadro 2. Composição da solução de Clark adaptada

Reagente	Completa	Omissão de Ca	Omissão de B
	$\mu\text{mol.L}^{-1}$		
NH ₄ NO ₃	2,925	2,925	2,925
KH ₂ PO ₄	0,138	0,138	0,138
K ₂ SO ₄	0,30	0,30	0,30
KCl	0,53	0,53	0,668
CaCl ₂	1,30	-	1,30
MgSO ₄	0,30	0,30	0,30
	$\mu\text{mol.L}^{-1}$		
H ₃ BO ₃	19,00	19,00	-
MnCl ₂	7,00	7,00	7,00
ZnSO ₄	2,00	2,00	2,00
CuSO ₄	0,50	0,50	0,50
Na ₂ MoO ₄	0,086	0,086	0,086
Fe-EDTA	40,00	40,00	40,00

Após esse período, as mudas foram submetidas aos tratamentos em presença ou ausência de Ca e, ou, B por mais 16 dias. Completados 30 dias, foi imposta restrição hídrica gradativa com polietileno glicol 6000 (PEG 6000), em 50 % dos vasos, com aumento de sua quantidade gradativamente, até atingir os potenciais hídricos de -0,16 MPa, -0,65 MPa e -1,00 MPa. Além de simular condições de campo, onde há uma redução gradativa da disponibilidade de água no solo na ausência de chuvas, a diminuição gradual do potencial hídrico reduz a possibilidade de perda de plantas por efeito de toxicidade ao PEG. Dessa forma, os tratamentos foram assim constituídos conforme quadro 3.

Quadro 3. Tratamentos utilizados na condução do experimento.

TRATAMENTO	Ca	B	ESTRESSE HÍDRICO
+Ca+BSE	SIM	SIM	NÃO
+Ca-BSE	SIM	NÃO	NÃO
-Ca+BSE	NÃO	SIM	NÃO
-Ca-BSE	NÃO	NÃO	NÃO
+Ca+BCE	SIM	SIM	SIM
+Ca-BCE	SIM	NÃO	SIM
-Ca+BCE	NÃO	SIM	SIM
-Ca-BCE	NÃO	NÃO	SIM

Os tratamentos constituíram um fatorial 2 x 4 x 2 (clones x ausência/presença de Ca e B x ausência/presença de estresse hídrico). O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com dois clones e com cinco repetições.

2.2 Coleta de dados

A troca da solução nutritiva e aumento das doses de PEG foram realizadas a cada 6 dias. As avaliações e coleta de material vegetal foram realizadas ao 12º (estresse hídrico de -0,65 MPa) e 18º dias (estresse hídrico de -1,0 MPa), após iniciar a imposição do estresse hídrico, imediatamente antes da troca da solução nutritiva e aumento das doses de PEG. Com os dados de matéria seca total das plantas coletadas no 12º dia (-0,65 MPa) e 18º dia (-1,0 MPa) foi determinado o crescimento relativo dos materiais submetidos ou não ao estresse hídrico pela fórmula $((MST_{-1MPa} - MST_{-0,65 MPa}) / MST_{-1MPa}) \times 100$.

2.3 Trocas gasosas

Em cada repetição foi selecionada uma planta para a medição de trocas gasosas. A taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), a concentração interna de CO₂ (C_i), juntamente com a razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_a) foram determinadas por analisador de gás infravermelho (IRGA; LI-6400xt, LI-COR, USA), em folhas completamente expandidas. As medições foram realizadas entre 8:00 e 12:30 h utilizando radiação fotossinteticamente ativa constante ($1400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e concentração atmosférica de CO₂, temperatura e umidade ambientes.

As plantas submetidas à determinação de trocas gasosas foram posteriormente utilizadas para a coleta de material vegetal, sendo separadas em raízes, caule, folhas velhas e folhas novas. O material foi levado para estufa com circulação de ar, a 65 °C por 72h, para posterior pesagem, moagem em moinho tipo Wiley e análises químicas.

2.4 Análise da fluorescência da clorofila a

As medições de fluorescência da clorofila a foram realizadas no escuro, entre 3:00 e 5:00 h com auxílio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR). As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência mínima (F₀) e fluorescência máxima (F_m) e o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII) dado por $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$, onde F_v é a fotossíntese variável. As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência (obtidas no claro) foram obtidas sequencialmente com a aplicação de uma

iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (Fm'). A partir destes, foi calculada a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [((F_m - F_0 / F_m) + (F_0 / F_m'))]$ (Oxborough e Baker, 1997) e os coeficientes de extinção fotoquímico: $q_P = (F_m' - F_v) / (F_m' - F_0')$ e $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') \cdot (F_0' / F)$, o qual, pelo modelo lake, fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII (Kramer, 2004) e o coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência, $q_N = (F_m - F_m') / (F_m - F_0')$ (Lichtenthaler et al., 2005). Para as formas de dissipação de energia, foram utilizadas as seguintes fórmulas, propostas por Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004): $Y_{II} = (F_m' - F) / F_m'$, que é o rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII; $Y_{NPQ} = (F / F_m') - (F / F_m)$ – que é o rendimento quântico da dissipação de energia regulada; $Y_{NO} = F / F_m$ que é a dissipação de energia não regulada.

O Y_{II} calculado foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ (Bilger et al., 1995), onde PAR é a radiação fotossinteticamente ativa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha, no caso $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e 0,84 o valor de referência correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

2.5 Teores de nutrientes

Foi realizada a determinação dos teores de nutrientes em raízes, folhas velhas e folhas novas. Para a determinação de B, aproximadamente 0,3 g foram calcinados por 3 h a 550°C em cadinhos de porcelana e, em seguida, o resíduo foi dissolvido em 10 mL de ácido clorídrico, na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O resíduo foi passado por filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e armazenado em recipientes plásticos. Os teores de B no tecido vegetal foram quantificados por colorimetria, pelo método da Azometina-H. Os de Ca, por digestão nitroperclórica e quantificado por meio de espectrofotometria de emissão óptica, com plasma acoplado por indução (ICP-OES).

Foi gerada relação Ca/B para ambos os clones, calculada pelo quociente entre o teor de Ca e B dado por $\text{dag} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados de trocas gasosas, teores de B e Ca, matéria seca da parte aérea, matéria seca de raízes, matéria seca de folhas novas e matéria seca total foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, o grau de liberdade das interações foi desdobrado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,10$) utilizando-se o software STATISTICA 7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria seca

A disponibilidade de água foi o principal fator limitante à produção de matéria seca da parte aérea dos clones (Figuras 1 e 2), confirmando resultados obtidos por Nunes (2010) e Reis (2011). A redução relativa de matéria seca da parte aérea se intensificou à medida que a intensidade do estresse aumentou de -0,65 para -1,0 MPa. O clone sensível (i042), apesar de apresentar maior MST, mostrou maiores perdas quando submetido ao estresse hídrico mais intenso (-1,0 Mpa).

Quando o estresse hídrico foi menos intenso (-0,65 Mpa) ambos os clones não apresentaram diferenças de matéria seca entre tratamentos com e sem estresse, o que pode ser decorrente de crescimento acumulado antes da imposição dos tratamentos, visto que houve redução nos indicadores de trocas gasosas (Figura 1).

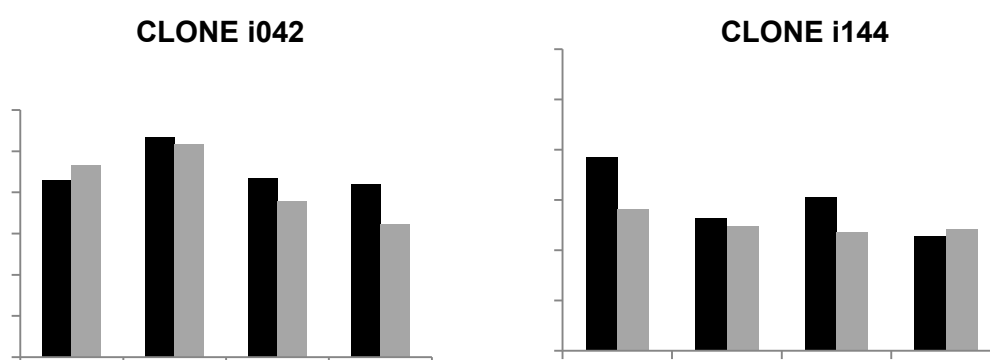


Figura 1 - Matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR) e matéria seca total (MST) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -0,65 MPa. Continua...

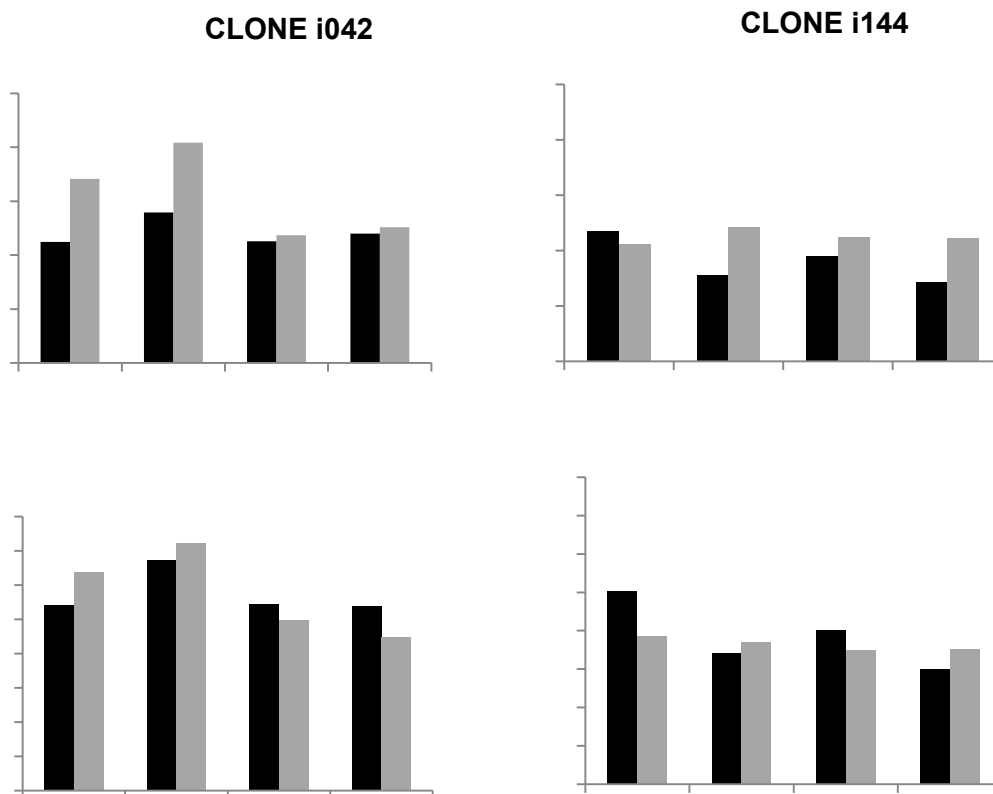


Figura 1 – (Cont.) Matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR) e matéria seca total (MST) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -0,65 MPa.

A matéria seca total das plantas, considerando apenas a presença ou ausência de estresse hídrico a -0,65 MPa, foi de 46,02 g e 46,07 g, respectivamente, para o clone i042 e de 30,93 e 29,14, respectivamente, para o clone i144 (Figura 1).

A maior sensibilidade ao estresse hídrico do clone i042 é respaldada pela maior redução de seu crescimento sob a tensão de -1,0 MPa. Neste sentido, verifica-se que a diferença relativa de MST entre tratamentos com e sem estresse hídrico para esse material genético foi de 25%. Já no clone tolerante (i144), a diferença foi de 13%, resultados coerentes com os observados em campo, que confirmam sua maior tolerância ao estresse hídrico (Figura 2).



Figura 2 - Taxa de crescimento relativo de biomassa total de clones sob efeito ou não de estresse hídrico.

A diferença na relação raiz/parte aérea para os dois clones foi maior quando submetidos ao estresse hídrico, com os valores de 0,41 para o i042 e 0,39 para o i144, comparados a 0,20 e 0,31 quando sem estresse, respectivamente. Em trabalho de campo com clones de eucalipto, Neves (2000) sugeriu que uma menor relação raiz/parte aérea seria um indicativo de ambientes sem maiores restrições ao cultivo dessa espécie. Em experimento com solução nutritiva, Reis (2011) obteve maior relação raiz/parte aérea de clone de eucalipto submetido ao estresse hídrico (0,34) em comparação com a ausência de estresse (0,31). Esse tipo de resposta normalmente está associado a mecanismo de tolerância ao estresse hídrico, haja vista que em condições de baixa disponibilidade de água no solo, as plantas investem mais carboidratos no crescimento do sistema radicular, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes (Marschner, 2012).

A produção de matéria seca foi influenciada diferencialmente pelo Ca e B em condições de estresse hídrico, sendo que para o clone i144 também foi observada diferença no tratamento sem estresse, obtendo os maiores valores de matéria seca quando associado ao Ca (Figura 3). Para o clone i042 os tratamentos com presença de B obtiveram maior produção de MST. Estes resultados, em parte, diferem dos obtidos por Nunes (2010) que observou que o fornecimento de B promoveu maior ganho de MST apenas no clone tolerante. Segundo Cakmak e Römheld (1997), o B afeta muitos processos fisiológicos da planta, e sua deficiência interfere no transporte de açúcares, síntese da parede celular, lignificação, estrutura da parede celular, metabolismo de carboidratos, metabolismo de RNA, respiração, metabolismo fenólico, metabolismo de ascorbato e integridade da membrana plasmática. Os distúrbios causados reduzem a produção de matéria seca tanto da parte aérea como do sistema radicular. Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a sugestão da importância do B na mitigação dos efeitos

do estresse hídrico e no clone i144 há uma tendência do Ca desempenhar papel semelhante ou mesmo mais intenso que o do B. Ballester-Fernandez et al. (1997), trabalhando com feijão, e Abdel-Basset (1998), trabalhando com plantas de *Vicia faba*, obtiveram resultados semelhantes aos aqui apresentados, pelos quais há atenuação dos efeitos do estresse hídrico quando realizada aplicação de Ca. O Ca é importante na síntese de novas paredes celulares, em particular a lamela média, que separa células recentemente divididas (Taiz e Zeiger, 2013). É também necessário para o funcionamento normal das membranas celulares e lhe tem sido atribuído o papel de mensageiro secundário em várias respostas das plantas, tanto a sinais ambientais quanto a hormonais (White e Broadley, 2003; Hetherington e Brownlle, 2004). Ainda, de acordo com os níveis intracelulares, o Ca possui efeito regulador sobre as aquaporinas, que são proteínas integrais que formam canais seletivos de água através da membrana, facilitando sua entrada na célula, auxiliando na manutenção do turgor celular (Taiz e Zeiger, 2013). Existe um grande número de famílias de aquaporinas em plantas, o que pode indicar que o transporte de água dentro de tecidos vegetais é complexo e rigorosamente regulado para permitir a sua adaptação às alterações das condições ambientais ou de desenvolvimento (Vandeleur et al., 2005 ; . Kaldenhoff et al., 2008). Foi demonstrado que padrões de expressão específica de tecidos de numerosos homólogos de aquaporinas e sua regulação em plantas são afetados por fatores ambientais, tais como ciclos de dia/noite, estresse hídrico ou patógenos (Gerbeau et al., 2002). Isto sugere que as plantas têm uma capacidade para regular a absorção e perda ou deslocamento de água dentro das células e tecidos de plantas. Kim e Steudle (2007) mostraram que células extraídas de nervuras da folha de milho apresentaram incremento da condutividade hidráulica sob condição de luminosidade moderada, mas uma redução na turgescência causada pela transpiração compensou esse efeito. Aumentando a luminosidade e sob condições experimentais que impediam queda na turgescência, a condutividade hidráulica foi reduzida, o que resultou em uma inibição das aquaporinas pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kim e Steudle, 2009). Em ambos os experimentos houve perfusão das folhas de milho com solução de CaCl_2 .

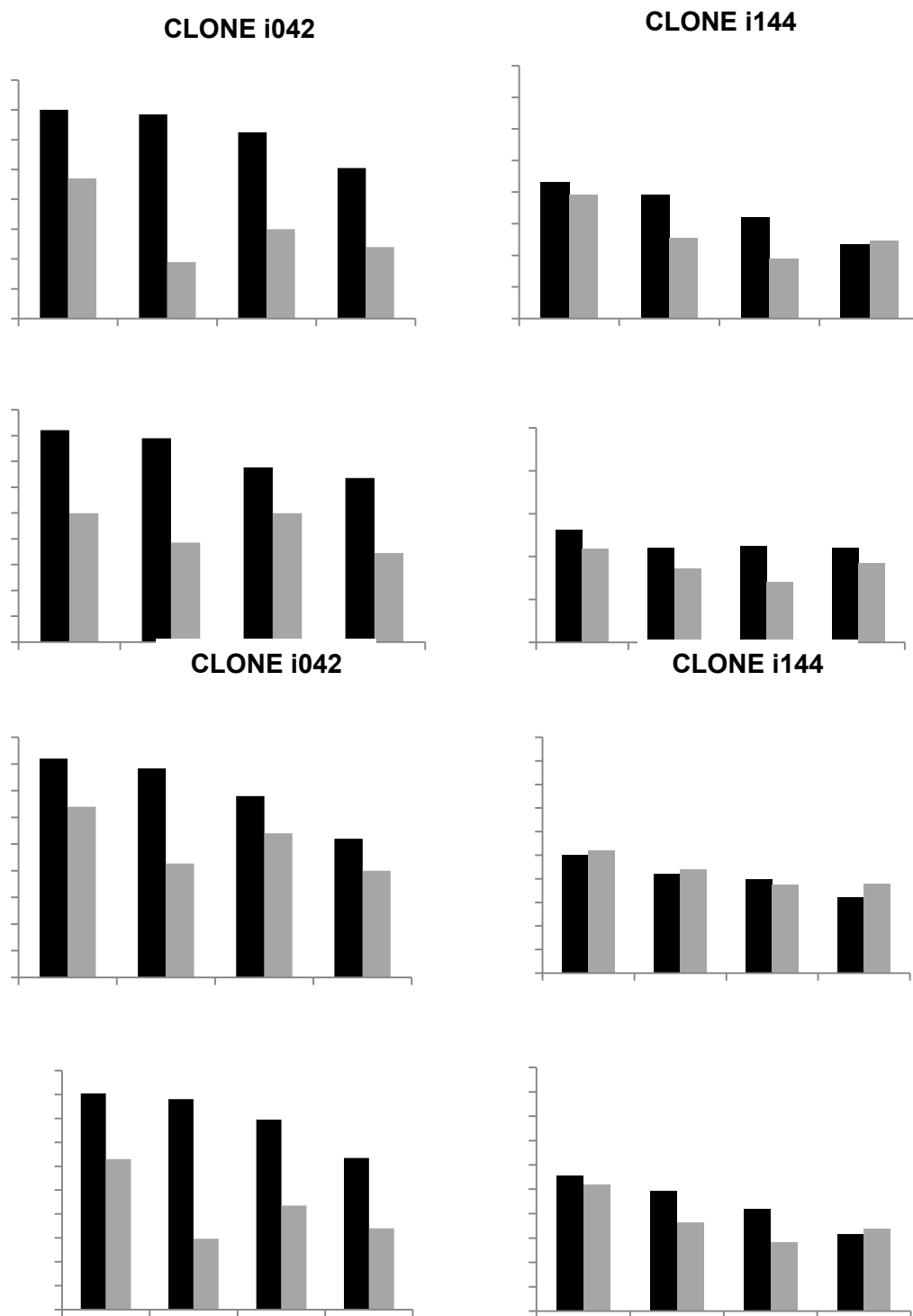


Figura 3 - Matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de folhas (MSF), matéria seca de raiz (MSR) e matéria seca total (MST) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -1,0 MPa.

3.2 Teores de B e Ca

Em ambos os clones, os teores de B nos tecidos das plantas foram consistentes com a aplicação do nutriente, ou seja, onde foi aplicado o nutriente houve maior teor. O teor também foi influenciado pela condição hídrica (Quadro 3). Em folhas jovens os maiores teores de B foram observados nos tratamentos com presença de B e déficit hídrico (tratamentos **+Ca+BCE** e **-Ca+BCE**). Em folhas velhas o mesmo comportamento foi observado para o clone i042. Estes resultados indicam um efeito de concentração devido a menor produção de matéria seca de folhas (MSF) sob a condição de déficit hídrico. Já em raízes, os teores de B pouco se diferenciaram entre tratamentos no clone i042, havendo um maior acúmulo no **+Ca+BSE** e **+Ca+BCE**. Para o clone i144 não houve diferença entre os tratamentos. O mesmo foi verificado na comparação entre clones no mesmo tratamento.

Quadro 3: Teores de B e Ca das folhas jovens (FJ), folhas velhas (FV) e raízes (R) nos clones i042 e i144 nos submetidos ou não ao estresse hídrico e à presença ou ausência de cálcio e boro

Parte da Planta	Clone	Tratamento	Teor B (mg.kg ⁻¹)	Teor Ca (g.kg ⁻¹)
FJ	i042	+Ca+BSE	83,40	1,37
		+Ca-BSE	45,63	1,26
		-Ca+BSE	78,27	0,98
		-Ca-BSE	50,90	1,07
		+Ca+BCE	99,39	1,11
		+Ca-BCE	64,26	1,45
		-Ca+BCE	96,90	0,99
		-Ca-BCE	59,66	0,88
FV	i042	+Ca+BSE	74,05	6,72
		+Ca-BSE	38,14	6,22
		-Ca+BSE	64,68	5,08
		-Ca-BSE	37,12	5,12
		+Ca+BCE	77,20	5,95
		+Ca-BCE	72,54	7,65
		-Ca+BCE	96,54	5,37
		-Ca-BCE	80,05	5,17
R	i042	+Ca+BSE	60,56	0,85
		+Ca-BSE	43,08	1,02
		-Ca+BSE	51,65	0,49
		-Ca-BSE	45,04	0,52
		+Ca+BCE	60,24	1,50
		+Ca-BCE	45,29	1,61
		-Ca+BCE	52,04	0,52
		-Ca-BCE	41,87	0,59
FJ	i144	+Ca+BSE	96,04	1,97
		+Ca-BSE	65,37	2,11

		-Ca+BSE	99,65	1,54
		-Ca-BSE	72,49	1,56
		+Ca+BCE	103,16	1,57
		+Ca-BCE	85,81	1,84
		-Ca+BCE	104,17	1,15
		-Ca-BCE	73,14	1,26
		+Ca+BSE	83,84	8,75
		+Ca-BSE	48,26	8,87
		-Ca+BSE	89,57	7,10
		-Ca-BSE	56,59	7,23
FV	i144	+Ca+BCE	75,39	9,13
		+Ca-BCE	63,59	10,36
		-Ca+BCE	92,61	6,17
		-Ca-BCE	43,43	5,53
		+Ca+BSE	70,24	1,62
		+Ca-BSE	55,94	2,13
		-Ca+BSE	58,63	0,66
		-Ca-BSE	64,84	0,90
R	i144	+Ca+BCE	70,24	2,05
		+Ca-BCE	65,03	2,26
		-Ca+BCE	63,51	0,98
		-Ca-BCE	55,70	0,90

+Ca+BSE: com Ca e com B sem estresse hídrico; **+Ca-BSE:** com Ca e sem B sem estresse hídrico; **-Ca+BSE:** sem Ca e com B sem estresse hídrico; **-Ca-BSE:** sem Ca e sem B sem estresse hídrico; **+Ca+BCE:** com Ca e com B com estresse hídrico; **+Ca-BCE:** com Ca e sem B com estresse hídrico; **-Ca+BCE:** sem Ca e com B com estresse hídrico; **-Ca-BCE:** sem Ca e sem B com estresse hídrico (- 1,0 MPa).

Semelhante ao ocorrido com o B, os teores de Ca nos tecidos das plantas foram consistentes com a aplicação do nutriente, sendo influenciados pela presença de déficit hídrico apenas em raízes, onde os teores foram maiores. Este resultado também sugere um efeito de concentração do nutriente pela menor quantidade de matéria seca produzida nos tratamentos com estresse hídrico. Na comparação entre clones foram observados maiores teores de Ca no clone i144, o que induziria o mesmo raciocínio sobre um efeito de concentração não fossem os teores deste nutriente obtidos em raízes do clone tolerante sob o efeito de estresse hídrico. Há indícios que o clone i144 absorva e acumule mais Ca do que o i042, pois seu teor de Ca nas raízes foi maior sem que tenha havido um efeito de concentração (Quadro3). A análise de variância ($p < 0,10$) para MSR mostrou não haver diferença estatística entre clones nos tratamentos com presença de estresse hídrico, demonstrando que o clone tolerante possui maior capacidade de absorção e acúmulo de Ca.

Os maiores teores de Ca foram encontrados em folhas velhas, com destaque para o clone i144 por sua maior capacidade de acúmulo do nutriente. A relação Ca x B foi

consistentemente maior no clone i144 do que no i042, à exceção no tratamento em que os dois nutrientes foram omitidos sem que a restrição hídrica fosse aplicada (Figura 4). Esta é mais uma evidência da maior demanda de Ca pelo i144.

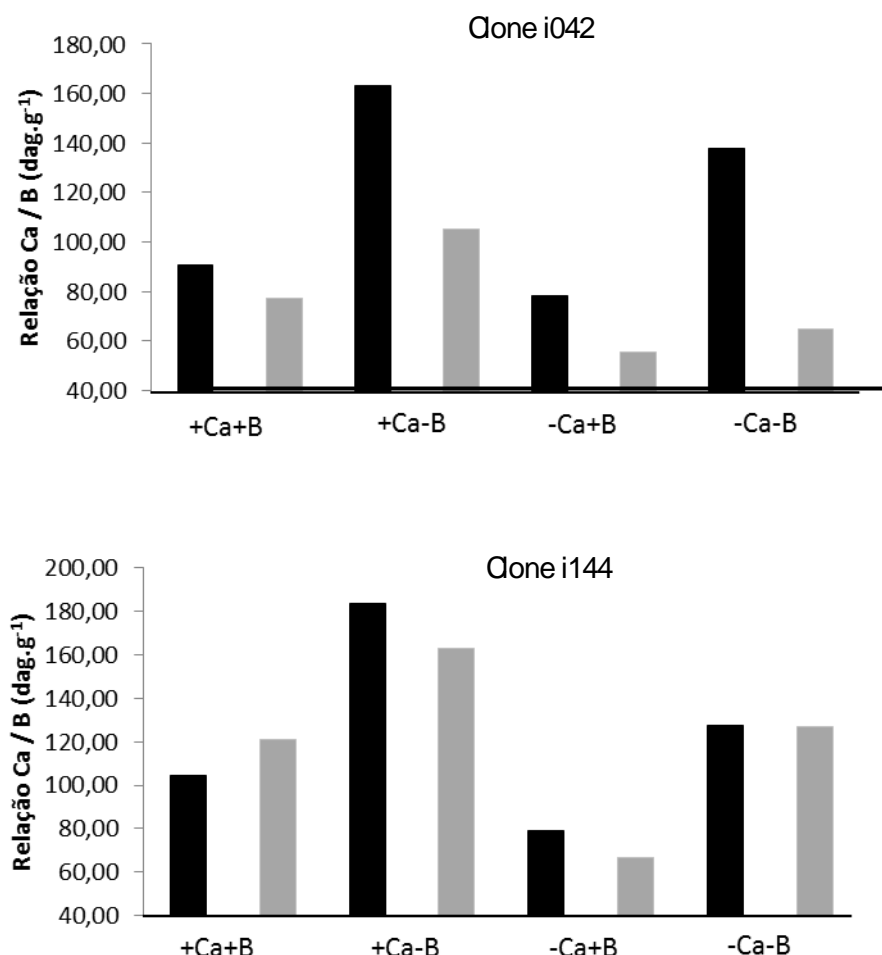


Figura 4 – Relação Ca x B em $\text{dag}\cdot\text{g}^{-1}$ dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de $-1,0$ MPa.

3.3 Trocas Gasosas

O estresse hídrico afetou negativamente a taxa fotossintética (**A**), a condutância estomática (**gs**) e a taxa transpiratória (**E**) de ambos os clones (Figura 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Lima et al. (2003) em diferentes espécies de eucalipto. Segundo Faria et al. (1998) e Taiz e Zeiger (2013), o déficit hídrico é um dos fatores que mais limitam a fotossíntese e o crescimento, fato respaldado pelos resultados aqui apresentados.

Em boas condições hídricas o clone i042 apresentou, em relação ao clone i144, maiores valores de **A**. A diferença, apesar de não se mostrar tão alta (6%), foi

significativa ($p < 10$). Já em condições de estresse hídrico **A** não diferiu entre os clones. Esperava-se que a diferença percentual em **A** entre plantas com e sem estresse fosse menor para o clone tolerante, o que não foi confirmado. Ela foi semelhante para os dois clones (24%), o que indica que os efeitos de uma restrição hídrica correspondente a -1,0 MPa suplantam os possíveis mecanismos, controlados geneticamente, de mitigação à seca.

Em condições de estresse hídrico, o **B** e **Ca** afetaram diferentemente a **A** dos clones. O clone i042 na presença apenas de **B** e sob estresse hídrico (-Ca+BCE) apresentou valores semelhantes ($16,5 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) ($p < 10$) àqueles na melhor condição nutricional sem estresse ($19,7 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$). Já o clone i144 apresentou maior valor de **A** sob estresse hídrico quando na presença de **Ca**, o que condiz com os resultados anteriormente apresentados de matéria seca e teores do nutriente em FN e raízes. A **A** do +Ca+BSE foi de $16,8 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ contra $13,6 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ do +Ca+BCE e $16,3 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ do +Ca-BCE. Esses resultados corroboram aos encontrados por Silva et al. (comunicação pessoal), pelos quais, em condições de déficit hídrico, o **Ca** foi fundamental para redução dos efeitos do estresse hídrico na **A** de eucalipto, resultando em maiores taxas do que na ausência do **Ca**. Para os demais parâmetros de trocas gasosas, a resposta dos clones i042 e i144 ao **Ca** e ao **B** seguiu a mesma tendência (Figura 6). Marrichi (2009) cita que os nutrientes influenciam a fotossíntese de plantas em diversos aspectos relacionados à sua fisiologia. Um desses aspectos é o funcionamento e integridade da membrana plasmática.

Dentre os parâmetros avaliados a **gs** foi aquele mais fortemente afetado pela condição de estresse hídrico. Isto ocorre uma vez que a primeira e mais sensível resposta à deficiência hídrica é a diminuição da turgescência, por meio da qual ocorre o fechamento dos estômatos (Larcher, 2006). A diferença percentual entre tratamentos com e sem estresse foi de 64,5 %, com uma tendência de menor afetação da **gs** pelo estresse hídrico para o clone i144. Isto mostra que o eucalipto apresenta, ainda que em diferentes graus para diferentes materiais, controle estomático eficiente em condições de baixa disponibilidade hídrica, conforme também relatado por Almeida e Soares (2003) e Tatagiba (2006). Segundo Cunningham (2004), plantas submetidas a condições climáticas desfavoráveis tendem a se proteger contra desidratação, o que depende da funcionalidade dos estômatos no controle da perda de água pela transpiração (Lima et al., 2003). Em razão da taxa de transpiração (**E**) ser estritamente dependente da magnitude da abertura estomática, mensurada neste trabalho por meio da **gs**, as diferenças de **E** entre os tratamentos dentro de um mesmo clone foram quase idênticas

às observadas em **gs**. Apesar da mesma tendência observada para A quanto à resposta a B e Ca para os clones i042 e i144, nenhum dos tratamentos com estes nutrientes na condição de estresse hídrico mostrou resultado semelhante aos tratamentos na condição sem estresse.

Em relação à concentração interna de carbono (**C_i**) e relação carbono interno x carbono externo (**C_i/C_a**) não houve diferença entre clones, mesmo na condição sem estresse hídrico ($p < 5$) (Figura 6). Isto poderia sugerir maior eficiência na utilização de CO₂ pelo clone i144 em razão de sua menor condutância estomática, não fosse a maior A do clone i042, o que o levaria ao maior consumo de CO₂. Os dados deste trabalho indicam que as diferenças na **C_i** e **C_i/C_a** estão associadas somente à diminuição acentuada da condutância estomática, o que reflete a condição de estresse hídrico a que as plantas foram submetidas. Ainda em relação a **C_i** e **C_i/C_a**, somente o tratamento com a presença apenas de Ca (+Ca-BCE) foi semelhante aos tratamentos com condição hídrica normal ($p < 10$) no clone i144, o que reforça importante papel deste nutriente na mitigação desse tipo de estresse na ausência de B.

Os dados de trocas gasosas são consistentes com a produção de matéria seca e ambos são respaldados pela observação de campo, pela qual o clone i042, em situações onde o período de déficit hídrico não é tão prolongado, é mais produtivo que o clone i144 (informação pessoal). Ambos os clones são bastante exigentes em B. Na ocorrência de período prolongado de déficit hídrico o clone i042 rapidamente expressa sintomas que iniciam com a seca de ponteiros, avançando para uma murcha de folhas e dessecação total das árvores. Já o clone i144 é muito mais tolerante a essa condição, pouco expressando os sintomas descritos. Os resultados desse estudo sugerem que a tolerância deste clone pode estar ligada a uma maior capacidade de absorção e acúmulo de Ca e que, por sua maior abundância, muitos processos antiestresse como manutenção do turgor celular pela entrada de água nas células através das aquaporinas, mensageiro secundário a respostas ambientais, regulação do metabolismo antioxidante promovendo maior atividade das enzimas antiestresse (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD, peroxidase – POD), seriam favorecidos.

3.4 Fluorescência da Clorofila a

Em plantas submetidas a condições de déficit hídrico ocorre o desenvolvimento de estresse luminoso no fotossistema II (FSII), uma vez que a etapa fotoquímica da fotossíntese continua a absorver energia luminosa, mas a demanda por poder redutor da etapa bioquímica é menor, em função da redução das taxas fotossintéticas, que, por sua

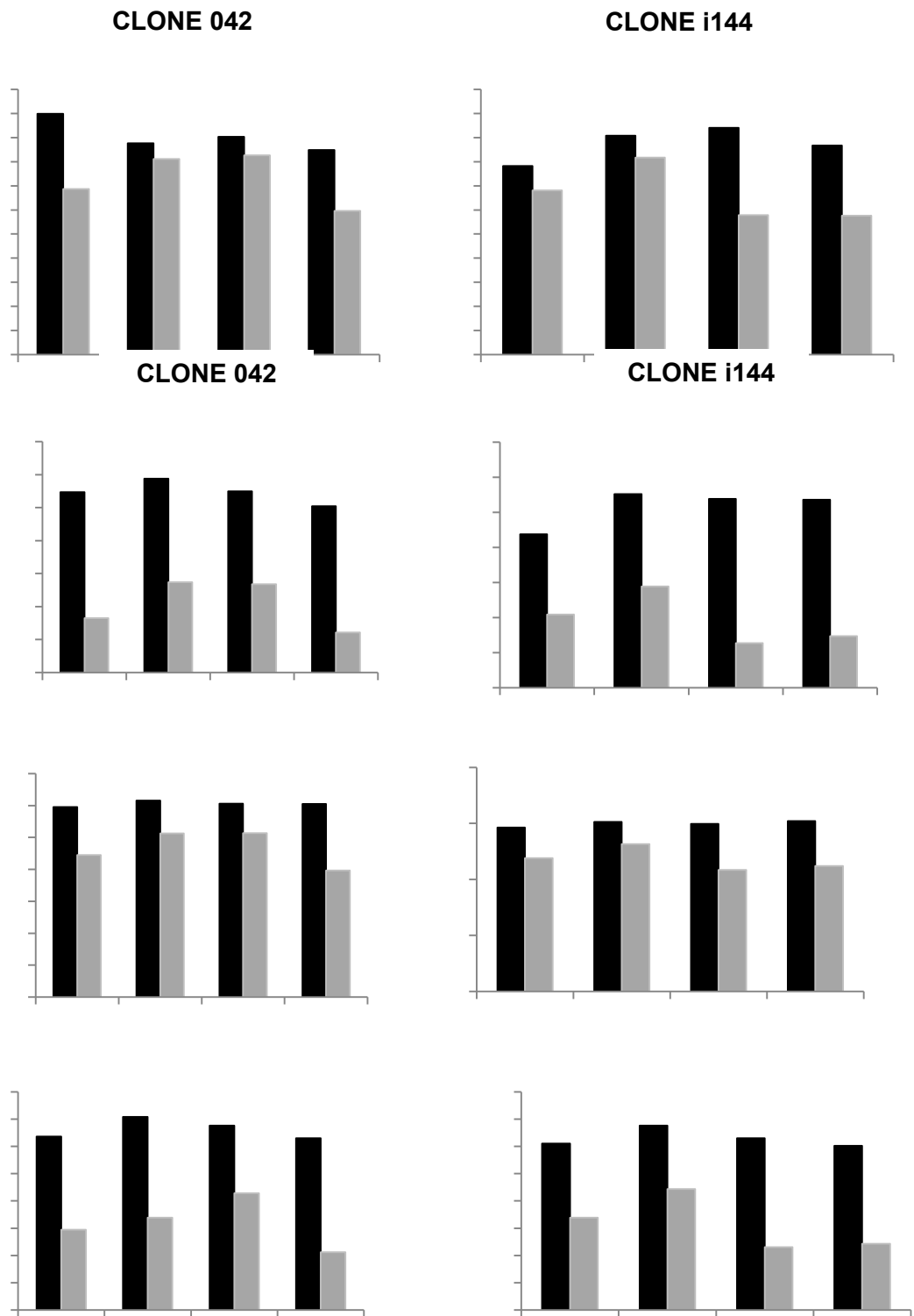


Figura 5: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -0,65 MPa. Continua...

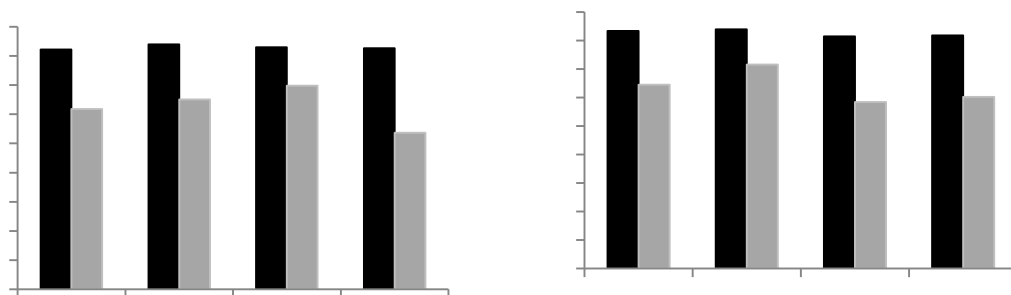


Figura 5: **(Cont.)** Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -0,65 MPa.

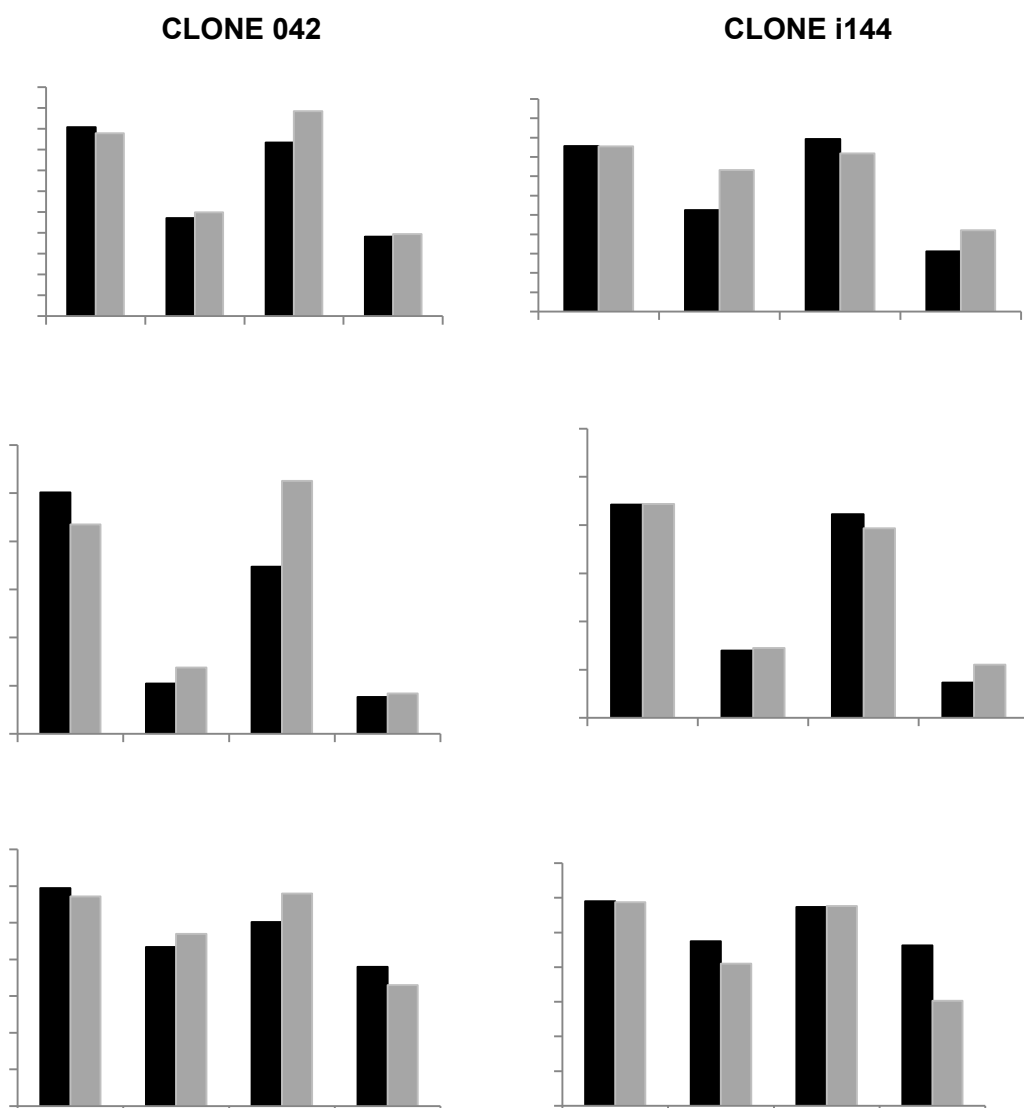


Figura 6: Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (■) de estresse hídrico de -1,0 MPa. Continua..

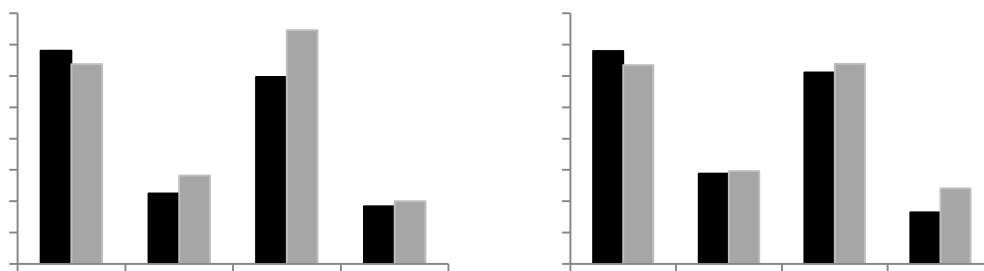


Figura 6: **(Cont.)** Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença (■) ou ausência (●) de estresse hídrico de $-1,0$ MPa.

vez, ocorre, inicialmente, em função do fechamento estomático. Por esta razão as análises de fluorescência da clorofila a vêm sendo utilizadas como bons indicadores do nível de estresse ao qual as plantas estão submetidas (Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993; Lichtenthaler e Miehe, 1997; Maxwell e Johnson, 2000).

Foi verificado em ambos os clones, que apenas para a condição de estresse hídrico, houve alterações na taxa de transporte de elétrons (ETR), no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y_{II}) e no rendimento quântico da dissipação de energia regulada no fotossistema II (Y_{NPQ}) (Figura 6). As quedas fotossintéticas foram associadas à significativa redução da ETR. Esta queda na ETR não está associada a quedas nos valores de q_L , indicando que os centros de reação do PSII não se oxidaram. O Y_{II} que mede a quantidade de energia utilizada na fotossíntese também foi significativamente reduzida pela condição de estresse hídrico. A energia não utilizada nos processos fotoquímicos foi dissipada, como observado pelo aumento do Y_{NPQ} . Esse parâmetro está relacionado ao processo pelo qual a energia luminosa é rapidamente dissipada no complexo antena do FSII (Pogson e Rissler, 2000; Pérez-Bueno et al., 2008). Essa dissipação de energia ocorre como forma de eliminar o excesso de energia absorvido no complexo antena do FSII, evitando, assim, danos foto-oxidativos (Klughammer e Schreiber, 2008). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Rocha (2013) em plantas de eucalipto submetidas ao estresse hídrico.

Figura 7: Taxa de transporte de elétrons (ETR), Coeficiente de extinção fotoquímico (qL), Rendimento quântico efetivo do Fotossistema II(Y_{II}) e Rendimento quântico de dissipação de energia regulada no Fotossistema II (Y_{NPQ}) em clones de eucalipto sob condições ou não de estresse hídrico a – 1,0 MPa.

Figura 8: Taxa de transporte de elétrons (ETR), Coeficiente de extinção fotoquímico (qL), Rendimento quântico efetivo do Fotossistema II(Y_{II}) e Rendimento quântico de dissipação de energia regulada no Fotossistema II (Y_{NPQ}) em clones de eucalipto sensível (i042) e tolerante (i144) ao estresse hídrico a – 1,0 MPa.

Na comparação entre os clones i042 e i144 ao estresse hídrico foi observado que o primeiro apresentou maior ETR e Y_{II} , mas menor Y_{NPQ} . O significado disto é que o i042 estaria dissipando menos energia na forma de calor, o que poderia levar a formação de espécies reativas de oxigênio devido ao excesso de elétrons não aproveitados no ciclo bioquímico da fotossíntese. Esta proposição se adequa a condição de maior sensibilidade do clone i042 ao estresse hídrico.

4 CONCLUSÕES

- O crescimento e as trocas gasosas em ambos os clones foram negativamente afetados pelo estresse hídrico, mas o papel do Ca e do B na mitigação dos efeitos do estresse variou com o clone. Para o clone mais sensível à seca o B permitiu mitigação mais acentuada enquanto que no mais tolerante o Ca foi mais efetivo na mitigação.
- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a tolerância ao estresse hídrico, comumente observado em campo para o clone i144, possa estar ligada à maior absorção e acúmulo de Ca, que favoreceria vários processos antiestresse na planta. São necessárias outras análises para confirmar esses efeitos positivos.
- Os resultados de fluorescência mostram que, comparativamente ao clone i144, o clone i042 possui maiores valores de ETR e Y_{II} , não acompanhados pela Y_{NPQ} , o que se traduziria numa maior formação de espécies reativas de oxigênio e maior sensibilidade ao estresse hídrico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BASSET, R. e ISSA, A. Membrane stabilization and survival of dehydrated *Chlorella fusca* cells induced by calcium. *Biol. Plant.*, 36: 389–395, 1994.

ABDEL-BASSET, R. Calcium channels and membrane disorders induced by drought stress in *Vicia faba* plants supplemented with calcium. *Physiol. Plant.*, 20: 149-153, 1998.

ALMEIDA, A.C. e SOARES, J.V. Comparação entre uso de água em plantações de *Eucalyptus grandis* e floresta ombrófila densa (Mata Atlântica) na costa leste do Brasil. *R. Árvore*, 27: 159-170, 2003.

BALLESTER-FERNANDEZ, G.; CERDÁ, G. e MARTÍNEZ, V. Role of calcium short-term responses of bean plants to osmotic or saline shocks. *J. PlantPhysiol.*, 151: 741-747, 1997.

BARROS, N.F. e COMERFORD, N.B. Sustentabilidade da Produção de Florestas Plantadas na Região Tropical. *Sociedade Brasileira Ciência Solo*, vol 2, p.487-592, 2002.

BOLAÑOS, L., LUKASZEWSKI, K., BONILLA, I., BLEVINS, D. Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 907–912, 2004.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, DO; Scurlock, JMO; Bolhàr-Nordenkampf, HR; Leegood, RC; Long, SP (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment*. Chapman e Hall, London, pp. 193-205, 1993.

BONILLA, I., EL-HAMDAOUI, A., BOLAÑOS, L. Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress. *Plant and Soil* 267: 97-107, 2004.

CAKMAK, I. e RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of celular functions in plants. In: DELL, B.; ROWN, P.H.; BELL, R.W. (eds.). *Boron in soil and plants: review*. Symposium, Chiang Mai, reprinted *Plant and Soil*, 193(1-2):71-83, 1997.

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

COOKE, A., COOKSON, A., e ARNSHAW, M.J. The mechanism of action on calcium in the inhibition on the high temperature induced leakage of betacyanin from beat root discs. *New Physiol.*, 102: 491-497, 1986.

CUNNINGHAM, S. C. Stomatal sensitivity to vapour pressure deficit of temperate and tropical evergreen rainforest trees of Australia. *Trees*, 18:399-407, 2004.

DELL, B. e MALAJCZUK, N. Boron deficiency in eucalypt plantations in China. *Can. J. For. Res.*, 24:2409-2416, 1994.

- EHLERINGER, J. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia*, 102:366-370, 1981.
- FARIA, T. SILVERIO, D., BREIA, E., CABRAL, R., ABADIA, A., ABADIA, J., PEREIRA, J. S. e CHAVES, M.M. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum*, 102: 419-428, 1998.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M. e BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990:87-92, 1989.
- GERBEAU, P., AMODEO, G., HENZLER, T., SANTONI, V., RIPOCHE, P., MAUREL, C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *The Plant Journal*, 30: 71–81, 2002
- GUPTA U.C. Boron nutrition of crops. *Adv. Agron.*, 31: 273-307, 1979.
- GUPTA UC, MACLEOD JA. Plant and soil boron as influenced by soil pH and calcium sources on podzol soils. *Soil Sci* 131: 20-25, 1981.
- HENDRICKSON, L.; FURBANK, R.T. e CHOW, W.S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynt. Research*, 82: 73-81, 2004.
- HETHERINGTON, A. M. e BROWNLE, C. The generation of Ca signals in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55: 401-427, 2004.
- HONEYSETT, J.L., BEADLE, C. L., TURNBULL, C. R. A. Evapotranspiration and growth of two contrasting species of eucalypts under non-limiting and limiting water availability. *Forest Ecology and Management*, 50: 3-4, 1992, 13p.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE e UNITED NATIONS. *Climate Change 2007: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge: Cambridge University Press, 996 p, 2007.
- KALDENHOFF, R., RIBAS-CARBO, M., FLEXAS-SANS, J., LOVISOLO, C., HECKWOLF, M., UEHLEIN, N. Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell and Environment*, 31: 658–666, 2008.
- KLUGHAMMER, C; SCHREIBER, U. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes*, 1: 27-35, 2008.
- KRAMER, D.M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O. e EDWARDS, G.E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynt. Research*, 79: 209-218, 2004.

KIM, Y.X., STEUDLE, E. Light and turgor affect the water permeability (aquaporins) of parenchyma cells in the midrib of leaves of *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 58: 4119–4129, 2007.

KIM, Y.X., STEUDLE, E. Gating of aquaporins by light and reactive oxygen species in leaf parenchyma cells of the midrib of *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 60: 547–556, 2009.

KOBAYASHI, M., NAKAGAWA, H., ASAKA, T., e MATOH, T. Borate-rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca^{2+} retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiology*, 119(1), 199-204, 1999.

LAISK, A. e LORETO, F. Determining Photosynthetic Parameters from Leaf CO_2 Exchange and Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiol.*, 11: 903-912, 1996.

LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima, 2006. 531p.

LI, M., WANG, G. e LIN, J. Application of external calcium in improving the PEG-induced water stress tolerance in liquorice cells. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 275-284, 2003.

LICHTENTHALER, H.K; MIEHE, J.A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci*, 2: 316-320, 1997.

LICHTENTHALER, H.K., BUSCHMANN, C., KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43: 379–393, 2005.

LIMA, W.P.; JARVIS, P. e RHIZOPOULOU, S. Stomatal responses of *Eucalypts* species to elevated CO_2 concentration and drought stress. *ScientiaAgricola*, 60:231-238, 2003.

LOCATELLI, M.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. e NOVAIS, R.F. Efeito de formas de nitrogênio sobre o crescimento e composição mineral de mudas de eucalipto. *R. Árvore*, 8:53-69, 1984.

MARRICHI, A., H. C. Caracterização da capacidade fotossintética e da condutância estomática em sete clones comerciais de *Eucalyptus* e seus padrões de resposta ao déficit de pressão de vapor. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz. 2009. 104 p. (Dissertação de Mestrado)

MARSCHNER, P. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Third Edition, San Diego, Academic Press, 2012, 651p.

MATTIELLO, E.M.; RUIZ, H.A.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L e BEHLING, M. Transporte de boro no solo e sua absorção por eucalipto. R. Bras. Ci. Solo, 33: 1281-1290, 2009.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. J. Exp. Bot.,51, 659-668, 2000.

NEVES, J. C. L. Produção e partição de biomassa, aspectos nutricionais e hídricos em plantios clonais de eucalipto na região litorânea do Espírito Santo. Campos dos Goytacazes. Universidade do Norte Fluminense. 2000. 191p. (Tese de Doutorado).

NUNES, F.N. Crescimento e expressão gênica em clones de eucalipto influenciados pelo boro e déficit hídrico. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2010. 65p. (Tese de Doutorado)

NUR, T.; BEN-AIRE, S.; LURIE, S. e ALTMAN, A. Involvement of divalent cations maintaining cell membrane integrity in stressed apple fruit tissues. J. Plant Physiol., 125: 47-60, 1986.

OXBOROUGH, K. e BAKER, N.R. An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and subcellular levels of organization. Plant Cell Environ., 20: 1473-1483, 1997.

PARR, A. J. e LOUGHMAN, B. C. Boron and membrane functions in plants. In: Metals and Micronutrients: Uptake and utilization by plants. Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 21: 87-107, 1983.

PÉREZ-BUENO, M.L.; JOHNSON, M.P.; ZIA, A.; RUBAN, A.V.; HORTON, P. The Lhcb protein and xanthophyll composition of the light harvesting antenna controls the DpH dependency of non-photochemical quenching in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett, 582:1477–1482, 2008.

PETRY, C. Adaptação de cultivares de soja a deficiência hídrica no solo. Santa Maria: UFSM, 1991. 106p. (Dissertação Mestrado)

POGSON, B.J.; RISSLER, H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. Phil Trans R Soc Lond, 355: 1395-1403. 2000.

REIS, B. E. Expressão de genes relacionados à tolerância do eucalipto à seca influenciada pelo boro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2011. 41p. (Dissertação de Mestrado).

ROCHA, J. B.O. Resiliência de clones de eucalipto ao déficit hídrico e nutricional Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2013. 75p. (Tese de Doutorado)

TAIZ, L. e ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TATAGIBA, S.D. Crescimento inicial, trocas gasosas e status hídrico de clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. Alegre, Universidade Federal do Espírito Santo. 2006. 128p. (Dissertação de Mestrado).

TEASDALE, R. D. e RICHARDS, D. K. Boron Deficiency in Cultured Pine Cells. *Plant Physiology*, 93: 1071-1077, 1990.

VANDELEUR, R., NIEMIETZ, C.M., TILBROOK J., TYERMAN, S.D. Roles of aquaporins in root responses to irrigation. *Plant and Soil*, 274: 141–161, 2005.

WIMMER, M.A., GOLDBACH, H.E. Influence of Ca²⁺ and pH on the stability of different boron fractions in intact roots of *Vicia faba* L, *Plant Biol.*, 1: 632–637, 1999.

WHITE, P.J. e BROADLEY, M. R. Calcium in plants. *Ann. Bot.*, 92: 487-511, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho confirmam que o clone i144 é tolerante às condições de déficit hídrico. Depois de ter passado por um período de baixa precipitação pluviométrica seu PAA foi consideravelmente menor que o dos demais materiais genéticos que também estiveram sob a mesma condição. A Δ de lenho, uma possível característica para seleção precoce de materiais genéticos tolerantes à seca, mostrou correlação negativa com PAA nos dois primeiros anos de crescimento, o que pode ser decorrente de absorção de água de camadas mais profundas do solo. Existe também correlação entre a Δ do lenho senil com a Δ de folhas. Apesar disso, recomenda-se a utilização conjunta da Δ de folhas ou lenho com a $\delta^{18}\text{O}$ de folhas ou lenho para melhor identificação de materiais tolerantes. Em condições de casa de vegetação, a produção de matéria seca e as trocas gasosas em um clone tolerante (i144) e outro sensível (i042) à seca foram afetadas pela condição de estresse hídrico, mas esse efeito foi menos intenso quando as plantas estavam adequadamente nutridas com Ca e ou B. Observou-se que o clone i144 teve maior absorção e acúmulo de Ca em relação ao clone i042, o que sugere que a maior tolerância do primeiro possa estar relacionada a processos antiestresse na planta, como manutenção do turgor celular pela entrada de água nas células através das aquaporinas. Para o clone sensível, a presença de B se mostrou mais efetiva na mitigação dos efeitos do estresse. Os maiores valores de ETR e Y_{II} e menor valor de Y_{NPQ} para o clone i042 indicam formação mais intensa de espécies reativas de oxigênio o que explica sua maior sensibilidade ao estresse hídrico.

APÊNDICE

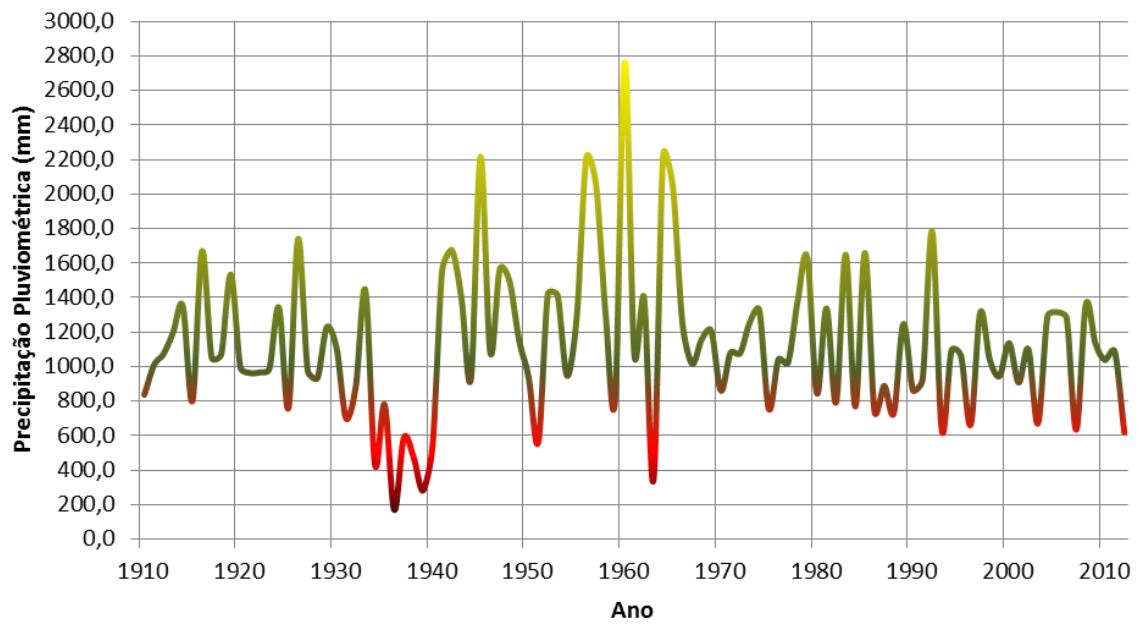


Figura 1A. Histórico da precipitação pluviométrica para a cidade de Montes Claros-MG.

Quadro 1A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para matéria seca de raiz (MSR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca total (MST) para clones de eucalipto submetidos ao estresse hídrico de – 0,65 MPa

	Degr. of Freedom	MSR SS	MSR MS	MSR F	MSR p	MSPA SS	MSPA MS	MSPA F	MSPA p	MST SS	MST MS	MST F	MST p
Intercept	1	345,7216	345,7216	665,7995	0,000000	3118,172	3118,172	699,2958	0,000000	3118,172	3118,172	699,2958	0,000000
CLONE	1	7,9700	7,9700	15,3488	0,000301	162,647	162,647	36,4761	0,000000	162,647	162,647	36,4761	0,000000
TRATAMENTO	7	9,1729	1,3104	2,5236	0,028068	41,286	5,898	1,3227	0,261911	41,286	5,898	1,3227	0,261911
CLONE*TRATAMENTO	7	5,3663	0,7666	1,4764	0,200027	40,933	5,848	1,3114	0,267058	40,933	5,848	1,3114	0,267058
Error	45	23,3666	0,5193			200,656	4,459			200,656	4,459		
Total	60	46,7899				442,389				442,389			

CLONE	TRAT.	MSR	1	2	3	CLONE	TRAT.	MSPA	1	2	3	CLONE	TRAT.	MST	1	2	3
i042	+Ca-BCE	4,09			****	i042	+Ca-BSE	10,70			****	i042	+Ca-BSE	10,70			****
i042	+Ca+BCE	3,41		****	****	i042	+Ca-BCE	10,36		****	****	i042	+Ca-BCE	10,36		****	****
i042	+Ca-BSE	2,79	****	****	****	i042	+Ca+BCE	9,32	****	****	****	i042	+Ca+BCE	9,32	****	****	****
i042	-Ca-BCE	2,52	****	****	****	i042	-Ca-BSE	8,99	****	****	****	i042	-Ca-BSE	8,99	****	****	****
i144	+Ca-BCE	2,43	****	****	****	i042	+Ca+BSE	8,57	****	****	****	i042	+Ca+BSE	8,57	****	****	****
i042	-Ca-BSE	2,40	****	****	****	i042	-Ca+BSE	8,34	****	****	****	i042	-Ca+BSE	8,34	****	****	****
i042	-Ca+BCE	2,37	****	****		i042	-Ca+BCE	8,01	****	****	****	i042	-Ca+BCE	8,01	****	****	****
i144	+Ca+BSE	2,36	****	****		i144	+Ca+BSE	8,00	****	****	****	i144	+Ca+BSE	8,00	****	****	****
i042	-Ca+BSE	2,26	****	****		i042	-Ca-BCE	6,43	****	****	****	i042	-Ca-BCE	6,43	****	****	****
i042	+Ca+BSE	2,25	****	****		i144	-Ca+BSE	6,11	****	****	****	i144	-Ca+BSE	6,11	****	****	****
i144	-Ca+BCE	2,25	****	****	****	i144	+Ca+BCE	5,62	****	****		i144	+Ca+BCE	5,62	****	****	
i144	-Ca-BCE	2,22	****	****		i144	+Ca-BSE	5,29	****			i144	+Ca-BSE	5,29	****		
i144	+Ca+BCE	2,12	****	****		i144	+Ca-BCE	4,96	****			i144	+Ca-BCE	4,96	****		
i144	-Ca+BSE	1,91	****	****		i144	-Ca-BSE	4,88	****			i144	-Ca-BSE	4,88	****		
i144	+Ca-BSE	1,56	****			i144	-Ca-BCE	4,85	****			i144	-Ca-BCE	4,85	****		
i144	-Ca-BSE	1,42	****			i144	-Ca+BCE	4,71	****			i144	-Ca+BCE	4,71	****		

Quadro 2A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para matéria seca de raiz (MSR), matéria seca de folha (MSF), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca total (MST) para clones de eucalipto submetidos ao estresse hídrico de – 1,00 MPa

	Degr. of Freedom	MSR SS	MSR MS	MSR F	MSR p	MSF SS	MSF MS	MSF F	MSF p	MSPA SS	MSPA MS	MSPA F	MSPA p	MST SS	MST MS	MST F	MST p
Intercept	1	560,1206	560,1206	484,9322	0,000000	1800,565	1800,565	442,5730	0,000000	5064,759	5064,759	469,3366	0,000000	8993,486	8993,486	488,8265	0,000000
CLONE	1	14,7426	14,7426	12,7636	0,000691	50,213	50,213	12,3421	0,000833	161,847	161,847	14,9979	0,000262	274,284	274,284	14,9083	0,000272
TRATAMENTO	7	7,2400	1,0343	0,8954	0,515782	121,821	17,403	4,2776	0,000652	346,147	49,450	4,5823	0,000355	442,113	63,159	3,4329	0,003630
CLONE*TRATAMENTO	7	10,5585	1,5084	1,3059	0,262655	43,598	6,228	1,5309	0,173611	133,190	19,027	1,7632	0,110954	215,918	30,845	1,6766	0,131370
Error	62	71,6131	1,1550			252,241	4,068			669,062	10,791			1140,683	18,398		
Total	77	104,6187				469,972				1317,713				2083,238			

CLONE	TRAT.	MSR	1	2	CLONE	TRAT.	MSF	1	2	3	4	CLONE	TRAT.	MSPA	1	2	3	CLONE	TRAT.	MST	1	2
i042	+Ca+BSE	4,05		****	i042	+Ca+BSE	8,21				****	i042	+Ca+BSE	14,01			****	i042	+Ca+BSE	18,06		****
i042	+Ca-BSE	3,92	****	****	i042	+Ca-BSE	7,90			****	****	i042	+Ca-BSE	13,70			****	i042	+Ca-BSE	17,61		****
i042	-Ca+BCE	3,45	****	****	i042	-Ca+BCE	6,76		****	****	****	i042	-Ca+BCE	11,03		****	****	i042	-Ca+BCE	14,11	****	****
i042	-Ca-BSE	3,08	****	****	i042	-Ca-BSE	6,36	****	****	****	****	i042	-Ca-BSE	10,59	****	****	****	i042	-Ca-BSE	13,67	****	****
i042	-Ca+BSE	3,08	****	****	i144	+Ca+BSE	5,24	****	****	****	****	i042	+Ca+BCE	8,91	****	****	****	i042	+Ca+BCE	11,85	****	****
i042	+Ca+BCE	2,94	****	****	i042	-Ca+BCE	4,99	****	****	****	****	i144	+Ca+BSE	8,62	****	****	****	i042	-Ca+BCE	11,74	****	****
i144	+Ca+BSE	2,48	****	****	i042	+Ca+BCE	4,99	****	****	****	****	i042	-Ca+BCE	8,28	****	****	****	i144	+Ca+BSE	11,10	****	****
i144	-Ca+BCE	2,44	****	****	i144	-Ca+BSE	4,50	****	****	****	****	i144	-Ca+BSE	7,49	****	****	****	i144	-Ca+BSE	9,81	****	****
i144	+Ca+BCE	2,43	****	****	i144	-Ca-BSE	4,40	****	****	****	****	i144	+Ca+BCE	7,32	****	****	****	i144	+Ca+BCE	9,75	****	****
i144	-Ca-BSE	2,34	****	****	i144	+Ca+BCE	4,38	****	****	****	****	i144	-Ca+BCE	7,19	****	****	****	i144	-Ca+BCE	9,53	****	****
i042	-Ca-BCE	2,32	****	****	i144	+Ca-BSE	3,99	****	****	****		i144	+Ca-BSE	6,47	****	****		i144	-Ca-BCE	8,56	****	
i144	-Ca+BSE	2,32	****	****	i144	-Ca-BCE	3,71	****	****	****		i144	-Ca-BCE	6,12	****	****		i144	+Ca-BSE	8,20	****	
i144	+Ca-BCE	2,15	****	****	i042	-Ca-BCE	3,45	****	****			i042	-Ca-BCE	5,88	****	****		i042	-Ca-BCE	8,20	****	
i042	+Ca-BCE	2,13	****	****	i144	+Ca-BCE	3,07	****	****			i144	+Ca-BCE	5,12	****	****		i144	+Ca-BCE	7,27	****	
i144	-Ca+BCE	2,13	****	****	i144	-Ca+BCE	2,82	****	****			i144	-Ca+BCE	4,75	****	****		i144	-Ca+BCE	6,88	****	
i144	+Ca-BSE	1,74	****		i042	+Ca-BCE	2,31	****				i042	+Ca-BCE	3,80	****			i042	+Ca-BCE	5,94	****	

Quadro 3A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença ou ausência de estresse hídrico de - 0,65 MPa

	Degr. of Freedom	A SS	A MS	A F	A p	gs SS	gs MS	gs F	gs p	Ci SS	Ci MS	Ci F	Ci p
Intercept	1	19953,56	19953,56	3591,336	0,000000	10,79813	10,79813	2164,373	0,000000	5700405	5700405	15016,96	0,000000
Tratamento	7	458,67	65,52	11,793	0,000000	2,66969	0,38138	76,444	0,000000	115727	16532	43,55	0,000000
Clone	1	24,23	24,23	4,361	0,040632	0,01331	0,01331	2,667	0,107189	26	26	0,07	0,794748
Interação Trat x Clone	7	70,52	10,07	1,813	0,099318	0,07172	0,01025	2,054	0,061148	6463	923	2,43	0,027966
Error	66	366,70	5,56			0,32928	0,00499			25053	380		
Total	81	937,30				3,13897				147858			

	Degr. of Freedom	E SS	E MS	E F	E p	Ci/Ca SS	Ci/Ca MS	Ci/Ca F	Ci/Ca p
Intercept	1	42,25886	42,25886	14754,06	0,000000	1834,446	1834,446	3511,448	0,000000
Tratamento	7	0,91472	0,13067	45,62	0,000000	252,796	36,114	69,128	0,000000
Clone	1	0,00006	0,00006	0,02	0,885285	0,908	0,908	1,738	0,191907
Interação Trat x Clone	7	0,05075	0,00725	2,53	0,022741	12,470	1,781	3,410	0,003599
Error	66	0,18904	0,00286			34,480	0,522		
Total	81	1,16005				306,553			

Clone	TRAT.	A Mean	1	2	3	4
i042	+Ca+BSE	19,69915				****
i042	-Ca+BSE	18,43590			****	****
i042	+Ca-BSE	18,35844			****	****
i144	-Ca+BSE	17,79892			****	****
i144	+Ca-BSE	17,54960			****	****
i042	-Ca-BSE	17,44647			****	****
i144	-Ca-BSE	17,37279			****	****
i144	+Ca+BSE	16,82468		****	****	****
i042	-Ca+BCE	16,53026		****	****	****
i144	+Ca-BCE	16,33724	****	****	****	****
i042	+Ca+BCE	14,71309	****	****	****	
i042	+Ca-BCE	14,02341	****	****	****	
i144	+Ca+BCE	13,61212	****	****	****	
i042	-Ca-BCE	11,92873	****	****		
i144	-Ca+BCE	11,57547	****			
i144	-Ca-BCE	11,23298	****			

Clone	TRAT.	gs Mean	1	2	3	4
i042	+Ca+BSE	19,69915				****
i042	-Ca+BSE	18,43590			****	****
i042	+Ca-BSE	18,35844			****	****
i144	-Ca+BSE	17,79892			****	****
i144	+Ca-BSE	17,54960			****	****
i042	-Ca-BSE	17,44647			****	****
i144	-Ca-BSE	17,37279			****	****
i144	+Ca+BSE	16,82468		****	****	****
i042	-Ca+BCE	16,53026		****	****	****
i144	+Ca-BCE	16,33724	****	****	****	****
i042	+Ca+BCE	14,71309	****	****	****	
i042	+Ca-BCE	14,02341	****	****	****	
i144	+Ca+BCE	13,61212	****	****	****	
i042	-Ca-BCE	11,92873	****	****		
i144	-Ca+BCE	11,57547	****			
i144	-Ca-BCE	11,23298	****			

Clone	TRAT.	Ci Mean	1	2	3	4
i144	+Ca-BSE	307,2670				****
i042	+Ca-BSE	307,1123				****
i144	+Ca+BSE	305,6405				****
i042	-Ca+BSE	303,2492				****
i042	-Ca-BSE	302,3152				****
i042	+Ca+BSE	300,3656				****
i144	-Ca-BSE	298,9579				****
i144	-Ca+BSE	298,1746				****
i144	+Ca-BCE	262,9321			****	****
i042	-Ca+BCE	256,6456			****	
i042	+Ca-BCE	240,0106		****	****	
i144	+Ca+BCE	237,9989	****	****	****	
i042	+Ca+BCE	229,1812	****	****	****	
i144	-Ca-BCE	218,4614	****	****		
i144	-Ca+BCE	216,9707	****	****	****	
i042	-Ca-BCE	198,3925	****			

Quadro 3A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença ou ausência de estresse hídrico de - 0,65 MPa (continuação)

Clone	TRAT.	E Mean	1	2	3	4
i042	+Ca-BSE	7,086669				****
i144	+Ca-BSE	6,763724				****
i042	-Ca+BSE	6,760819				****
i042	+Ca+BSE	6,358257				****
i042	-Ca-BSE	6,303361				****
i144	-Ca+BSE	6,298651				****
i144	+Ca+BSE	6,108371			****	****
i144	-Ca-BSE	6,020928			****	****
i144	+Ca-BCE	4,437521		****	****	
i042	-Ca+BCE	4,283276		****		
i144	+Ca+BCE	3,384558	****	****		
i042	+Ca-BCE	3,382315	****	****		
i042	+Ca+BCE	2,983117	****	****		
i144	-Ca+BCE	2,302375	****			
i144	-Ca-BCE	2,251529	****			
i042	-Ca-BCE	2,119622	****			

Clone	TRAT.	Ci/Ca Mean	1	2	3	4
i042	+Ca-BSE	0,839746				****
i144	+Ca-BSE	0,839265				****
i144	+Ca+BSE	0,833294				****
i042	-Ca+BSE	0,829945				****
i042	-Ca-BSE	0,826329				****
i042	+Ca+BSE	0,822488				****
i144	-Ca-BSE	0,817892				****
i144	-Ca+BSE	0,814117				****
i144	+Ca-BCE	0,715614			****	****
i042	-Ca+BCE	0,697931			****	
i042	+Ca-BCE	0,650587		****	****	
i144	+Ca+BCE	0,644491	****	****	****	
i042	+Ca+BCE	0,621527	****	****	****	
i144	-Ca-BCE	0,589189	****	****		
i144	-Ca+BCE	0,584757	****	****		
i042	-Ca-BCE	0,536160	****			

Quadro 4A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença ou ausência de estresse hídrico de - 1,0 MPa

	Degr. of Freedom	A SS	A MS	A F	A p	gs SS	gs MS	gs F	gs p	Ci SS	Ci MS	Ci F	Ci p
Intercept	1	13735,85	13735,85	2101,970	0,000000	5,667388	5,667388	556,6338	0,000000	4364966	4364966	457,3515	0,000000
trat. ID	7	1501,83	214,55	32,832	0,000000	2,333908	0,333415	32,7471	0,000000	229277	32754	3,4319	0,003485
Clone ID	1	0,00	0,00	0,000	0,993617	0,002889	0,002889	0,2838	0,596060	254	254	0,0266	0,870938
Interação Trat x Clone	7	94,20	13,46	2,059	0,060675	0,063115	0,009016	0,8856	0,522991	6902	986	0,1033	0,997952
Error	65	424,76	6,53			0,661800	0,010182			620360	9544		
Total	80	2047,05				3,118637				862623			

	Degr. of Freedom	E SS	E MS	E F	E p	Ci/Ca SS	Ci/Ca MS	Ci/Ca F	Ci/Ca p
Intercept	1	1510,319	1510,319	865,2600	0,000000	31,64566	31,64566	516,5661	0,000000
trat. ID	7	384,189	54,884	31,4431	0,000000	1,67792	0,23970	3,9128	0,001287
Clone ID	1	0,322	0,322	0,1844	0,669040	0,00129	0,00129	0,0210	0,885272
Interação Trat x Clone	7	4,779	0,683	0,3912	0,904270	0,05223	0,00746	0,1218	0,996548
Error	65	113,458	1,746			3,98200	0,06126		
Total	80	511,611				5,76057			

Clone	TRAT.	A Mean	1	2	3
i042	-Ca-BSE	19,61680			****
i042	+Ca+BSE	18,89285			****
i144	+Ca-BSE	17,96977			****
i042	-Ca+BSE	17,71814			****
i144	+Ca+BSE	17,18958			****
i144	-Ca+BSE	17,06476			****
i042	+Ca-BSE	16,95433			****
i144	-Ca-BSE	16,65124			****
i144	-Ca+BCE	14,93459		****	****
i144	+Ca+BCE	10,29721	****	****	
i042	-Ca+BCE	9,77200	****	****	
i042	+Ca+BCE	9,31055	****		
i042	-Ca-BCE	8,10562	****		
i042	+Ca-BCE	7,81510	****		
i144	-Ca-BCE	7,78123	****		
i144	+Ca-BCE	6,33492	****		

Clone	TRAT.	gs Mean	1	2
i042	+Ca+BSE	0,53165		****
i042	-Ca-BSE	0,50798		****
i144	+Ca+BSE	0,44310		****
i144	-Ca+BSE	0,44111		****
i144	+Ca-BSE	0,42970		****
i042	-Ca+BSE	0,42471		****
i042	+Ca-BSE	0,39356		****
i144	-Ca-BSE	0,38918		****
i144	-Ca+BCE	0,14539	****	
i144	+Ca+BCE	0,13305	****	
i042	-Ca+BCE	0,12678	****	
i042	+Ca+BCE	0,10345	****	
i144	-Ca-BCE	0,09352	****	
i042	-Ca-BCE	0,08060	****	
i042	+Ca-BCE	0,07880	****	
i144	+Ca-BCE	0,07322	****	

Clone	TRAT.	Ci Mean	1
i042	+Ca+BSE	298,0467	****
i144	+Ca+BSE	294,9993	****
i144	-Ca+BSE	292,8454	****
i144	+Ca-BSE	287,6100	****
i042	-Ca-BSE	286,9468	****
i144	-Ca-BSE	284,4796	****
i042	-Ca+BSE	280,8510	****
i042	+Ca-BSE	268,3223	****
i144	+Ca+BCE	233,2938	****
i144	+Ca-BCE	229,8546	****
i042	-Ca+BCE	228,4154	****
i042	+Ca+BCE	216,5614	****
i144	-Ca+BCE	202,9287	****
i042	+Ca-BCE	192,6555	****
i042	-Ca-BCE	142,3784	****
i144	-Ca-BCE	117,5895	****

Quadro 4A. Análise de variância e teste de médias (Tukey < 0,10) para Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), concentração interna carbono (Ci), taxa transpiratória (E) e relação carbono interno x carbono externo (Ci/Ca) dos clones i042 (sensível ao estresse hídrico) e i144 (tolerante ao estresse hídrico) submetidos aos tratamentos de presença (+) e ausência (-) de Ca e B e presença ou ausência de estresse hídrico de – 1,0 MPa (continuação)

Clone	TRAT.	E Mean	1	2	Clone	TRAT.	Ci/Ca Mean	1
i042	+Ca+BSE	7,450572		****	i042	+Ca+BSE	0,810787	****
i042	-Ca-BSE	7,326700		****	i144	+Ca+BSE	0,797226	****
i144	+Ca+BSE	6,792977		****	i144	-Ca+BSE	0,793542	****
i042	+Ca-BSE	6,612337		****	i042	-Ca-BSE	0,781182	****
i144	-Ca-BSE	6,424487		****	i144	+Ca-BSE	0,774280	****
i144	-Ca+BSE	6,370640		****	i144	-Ca-BSE	0,773384	****
i042	-Ca+BSE	6,254755		****	i042	-Ca+BSE	0,763353	****
i144	+Ca-BSE	6,194112		****	i042	+Ca-BSE	0,721581	****
i144	-Ca+BCE	2,988678	****		i144	+Ca+BCE	0,620840	****
i144	+Ca+BCE	2,806644	****		i042	-Ca+BCE	0,608610	****
i042	-Ca+BCE	2,715246	****		i144	+Ca-BCE	0,607443	****
i042	+Ca+BCE	2,248939	****		i042	+Ca+BCE	0,573304	****
i144	-Ca-BCE	2,113616	****		i144	-Ca+BCE	0,526382	****
i042	-Ca-BCE	1,944344	****		i042	+Ca-BCE	0,509616	****
i042	+Ca-BCE	1,850792	****		i042	-Ca-BCE	0,392130	****
i144	+Ca-BCE	1,664952	****		i144	-Ca-BCE	0,333670	****