

# Boletim

## TÉCNICO SIF

Número 10 - Volume 01  
Dezembro 2021

*Uso da morfologia foliar na  
discriminação de genótipos de  
eucaliptos tolerantes à seca*

*Franciele Santos Oliveira et. al.*

## USO DA MORFOLOGIA FOLIAR NA DISCRIMINAÇÃO DE GENÓTIPOS DE EUCALIPTOS TOLERANTES À SECA

Franciele Santos Oliveira<sup>2\*</sup>, Gabriel Vilela Ferreira<sup>3</sup>, Sérgio Henrique Carneiro<sup>4</sup>, Pablo Henrique Nunes Carvalho<sup>5</sup>, Leonardo Araujo Oliveira<sup>5</sup>, Genaina Aparecida de Souza<sup>2</sup>, Wagner Luiz Araújo<sup>6</sup>, Nairam Félix de Barros<sup>7</sup> e Glêison Augusto dos Santos<sup>8</sup>

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa, Doutora em Fisiologia Vegetal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <franciele.oliveira@ufv.br> e <genaina.souza@ufv.br>.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa, Graduando em Agronomia, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <gabriel.v.ferreira@ufv.br>.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <sergio.carneiro@ufv.br>.

<sup>5</sup> Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <pablonuness@hotmail.com> and <leonardooliveira@gmail.com>.

<sup>6</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <wlaraujo@ufv.br>.

<sup>7</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <nfbarrros@ufv.br>.

<sup>8</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Florestal, Viçosa, MG - Brasil. E-mail: <gleison@ufv.br>.

\*Corresponding author.

**RESUMO** – *A deficiência hídrica afeta diferentes culturas, levando a perdas de produtividade em todo o mundo. Perdas expressivas foram observadas no Brasil, particularmente em 2014, em áreas ocupadas por plantios de eucalipto em função da limitação hídrica, ocasionando quedas significativas de produtividade. Em razão desses efeitos, estudos estão sendo conduzidos para compreender os mecanismos expressados por eucalipto para tolerar à seca, tendo em vista que existem genótipos de eucalipto com tolerância diferencial à seca tolerantes, intermediárias e sensíveis). A morfologia foliar e anatomia vegetal são ferramentas interessantes e promissoras para selecionar materiais genéticos quanto à tolerância à seca. Além disso, com essas avaliações é possível observar características intrínsecas aos materiais genéticos e sua plasticidade fenotípica sob restrição hídrica. Para isso, foram utilizados cinco clones de eucalipto contrastantes quanto a tolerância à seca (tolerantes e sensíveis), em blocos casualizados, num esquema fatorial 5x2 (5 clones de eucalipto e 2 regimes hídricos- controle [solo mantido com umidade próxima à 100% da capacidade de campo (CC-controle)] e solo com umidade próxima à 70% da capacidade de campo (SM-seca moderada). Após um período de 120 dias sob esses dois tratamentos, as plantas submetidas a SM foram expostas a seca severa (SS) (potencial hídrico próximo a -3MPa) e em seguida reidratada – RI. Sob seca moderada foi possível observar a arquitetura da copa dos diferentes clones e a maneira como as folhas estavam dispostas. A área foliar específica, área foliar e distribuição dos tecidos do mesófilo foliar foram alterados em plantas sob seca moderada. A seca severa também promoveu alterações na arquitetura da copa. As variáveis avaliadas neste estudo são eficientes na discriminação de genótipos mais tolerantes à seca, tendo potencial para utilização como bioindicadores de tolerância à seca em clones de eucalipto e serem incluídas em programas de melhoramento genético visando a obtenção de genótipos mais tolerantes a esta condição.*

*Palavras-Chave: Déficit hídrico; Melhoramento; Anatomia.*



## 1. INTRODUÇÃO

Por serem organismos sésseis, as plantas estão constantemente sujeitas as variações ambientais que as cercam (Gollmack et al, 2013). Portanto, a compreensão de mecanismos fisiológicos utilizados pelas plantas no ambiente em que elas estão inseridas nos permite identificar qual a melhor forma de conduzir os cultivos tanto de espécies agrícolas quanto florestais (Otto et al., 2017). Esse maior entendimento pode permitir a seleção de materiais tolerantes aos mais diversos tipos de estresse, como por exemplo deficiência hídrica e os extremos de temperatura (Otto et al., 2017, Das et al, 2017; Eremina et al, 2016). Estes estresses vêm se tornando cada vez mais importante, frente ao avanço das mudanças climáticas globais, que têm levado ao aumento da frequência e intensidade dos eventos de seca, além da elevação da temperatura (IPCC 2021), acentuando ainda mais a importância da disponibilidade de água para os ecossistemas.

A deficiência hídrica causa declínio substancial na produtividade primária líquida por meio de impactos negativos nos processos fisiológicos (e.g. turgor e expansão celular, taxa fotossintética, atividade enzimática, absorção e assimilação de nutrientes), que levam, em última instância, a alterações no crescimento, reprodução e até mesmo na sobrevivência das plantas (Fahad et al, 2017; Bryant et al, 2021; Cohen et al, 2021). Em decorrência desse estresse, aproximadamente 200.000 hectares de florestas plantadas foram perdidos, somente no ano de 2014, em Minas Gerais (Gonçalves et al, 2017). Servindo como alerta para o setor florestal de uma possível recorrência desse fenômeno, o que poderia ser extremamente desastroso para a cadeia produtiva como um todo. Nesse sentido, a busca por materiais tolerantes à seca faz-se extremamente necessário e tem sido alvo de diferentes estudos.

A seca pode alterar também a área foliar específica (AFE), que permite inferir sobre o acúmulo de biomassa por unidade de área foliar (Poorter et al., 2009), sendo uma característica relacionada com o crescimento da planta (Cheng et al. 2016). Nesse sentido, decréscimos em AFE foram observados em clone de *E. camaldulensis* e redução no crescimento da parte aérea (Amrutha et al., 2019). Além disso, reduções na AFE, reduções em altura e biomassa podem ser visualizados sob condições de seca em eucalipto (Correia et al., 2013).

Adicionalmente, alterações morfoanatômicas são observadas em plantas sob seca e podem auxiliar na discriminação de genótipos contrastantes quanto a tolerância à seca. Dessa forma, é observado que a limitação hídrica promove redução de espaços intercelulares (Gomes, 2013), aumento na densidade de venação (Boer et al., 2016), alterações na espessura de tecidos (Otto et al., 2017), dentre outras alterações.

O objetivo desse trabalho foi avaliar como essas características morfoanatômicas podem auxiliar na discriminação de genótipos de eucalipto tolerantes à seca.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45'S e 42° 52'W, 672 m de altitude), sob condições controladas. Os clones foram selecionados com base em um ranking gerado pelas empresas participantes do projeto Tolerância à Seca em condição de campo, onde foram consideradas características de crescimento e sobrevivência das plantas durante um período de restrição hídrica severo entre os anos de 2015 e 2016. A partir deste ranking, foram utilizadas mudas de clones de eucalipto com diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico, sendo os clones tolerantes: VM01 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*), CO1275 (*E. camaldulensis* x *E. spp*), CO1445 (*E. urophylla* x *E. camaldulensis*) e sensíveis: I144 (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) e CNB016 (*E. urophylla* (híbrido espontâneo)). As mudas foram previamente cultivadas em tubete e posteriormente transferidas para vasos plásticos com capacidade de 21 L (uma planta por vaso) contendo uma mistura de solo e areia na proporção 1:1 (adubado conforme recomendações para a cultura).

Após o preparo do solo e transplantio das mudas para os vasos, as mesmas foram aclimatadas às condições ótimas, sendo irrigadas diariamente até 100% da capacidade de campo (CC) por cerca de 60 dias. Uma vez aclimatadas, metade das plantas foi submetida à seca moderada, de forma gradual, até a umidade do solo atingir 70% da CC, permanecendo sob essa condição por aproximadamente 120 dias, enquanto a outra parte permaneceu próximo à 100% da CC. O controle da umidade do solo foi feito diariamente através da utilização de um sensor de

umidade (modelo HH2 Moisture Meter, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK) com o auxílio de uma curva de calibração obtida através da correlação entre o teor de umidade aferida pelo sensor e a obtida por um método gravimétrico, possibilitando o cálculo da quantidade de água a ser repostada.

Após esse período, as plantas previamente submetidas à seca moderada foram expostas à seca severa, com a suspensão total da irrigação. O potencial hídrico ( $\psi_w$ ), foi medido diariamente na antemã com o auxílio de uma bomba de pressão tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, EUA) até atingir aproximadamente -3 MPa, bem como a observação de danos foliares visíveis causados pela seca. Ao atingir esse ponto, as plantas foram reidratadas e mantidas nessa condição até que parâmetros de recuperação, como incrementos na taxa fotossintética, retornassem a valores similares aos controles serem observados.

Para a determinação da área foliar específica (AFE), 15 folhas completamente expandidas do terço médio foram coletadas e digitalizadas em scanner (HP ScanJet 200) e mensuradas com auxílio do software Image-Pro Plus® (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Em seguida, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C até atingir massa constante. e a AFE foi determinada pela razão entre a área foliar (cm<sup>2</sup>) e a massa seca (g).

Para determinação da espessura dos tecidos, folhas desenvolvidas durante o período de seca foram coletadas e fixadas em formaldeído FAA<sub>50</sub> (Johansen, 1940) por 48 horas e armazenadas em etanol 70% (v v-1). Uma subamostra da região mediana da folha, contendo uma porção do limbo foi embebida em metacrilato (Historesina - Leica Microsystems Nussloch, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante, cortados com 5 µm de espessura utilizando-se um micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM2155, Leica Microsystems Inc., Derfeld, USA), corados com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964) e montados em resina sintética (Permout®). As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz (AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) acoplado a câmera fotográfica digital (Zeis AxioCan HRC, Göttinger, Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axio Vision. Com o auxílio do Image Pro

Plus foram avaliadas a espessura das epidermes inferior e superior, espessura do mesofilo, espessura total da folha e proporção de espaço intercelular.

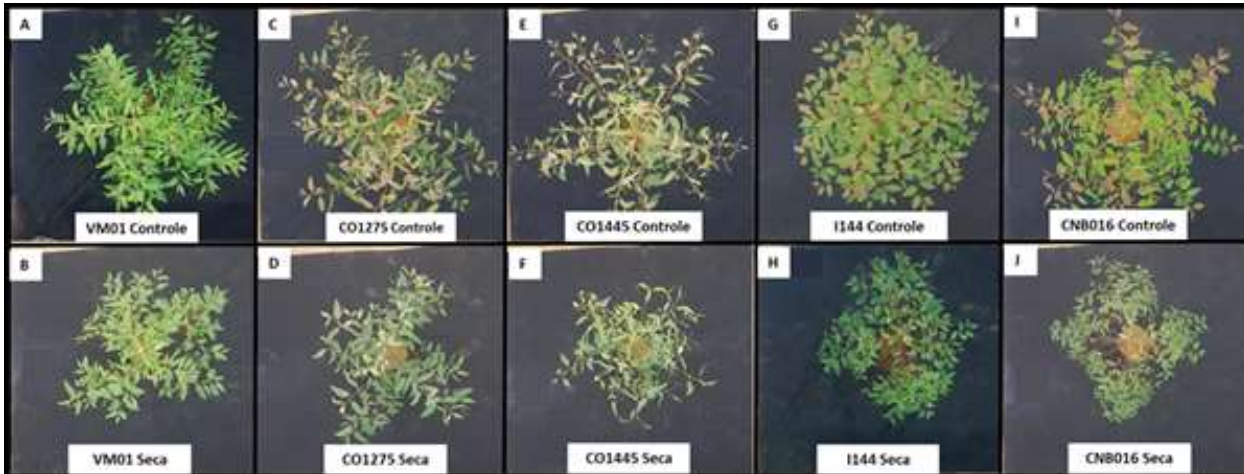
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ). As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Para a avaliação das premissas de normalidade dos resíduos aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seca moderada promoveu reduções acentuadas na biomassa foliar, alterando a arquitetura da copa (Figura 1). Folhas desenvolvidas sob seca, apresentaram alterações na área foliar específica (AFE) ao comparar todos os clones na mesma condição. Curiosamente, os clones tolerantes apresentaram redução nesta variável quando comparadas com os clones sensíveis (Figura 2).

Além disso, o único clone que apresentou diferença entre controle e seca foi o VM01, indicando certa plasticidade fenotípica.

Ao final da seca severa, notou-se grande perda de folhas. Clones tolerantes tenderam a manter suas folhas na parte interna da copa. Ao passo que os clones sensíveis apresentaram grande parte de suas folhas concentradas ao redor da copa (parte mais externa) (Figura 3). As folhas dos clones sensíveis foram descartadas com maior frequência, o que pode indicar que os potenciais hídricos próximos a -3MPa a que as plantas foram expostas tenham sido mais danosos a estes clones. Estes potenciais hídricos podem ter sido responsáveis por gerar tensões suficientemente altas no sistema hidráulico destas plantas capazes de induzir o processo de cavitação (quebra da coluna de água) (Sperry e Tyree 1989) e subsequente formação de embolismo que irão comprometer a funcionalidade do xilema (Brodribb e Cochard, 2009). Em níveis mais acentuados estes potenciais podem ser responsáveis por levar a planta à morte por falha hidráulica. Em trabalho realizado com *Persea americana*, Cardoso et al, 2020 verificaram que a mortalidade foliar pode ser causada por embolia induzida pela seca. Além disso, muitas espécies perdem sua área foliar antes de experimentarem níveis de cavitação que possam ser responsáveis por levar à falha hidráulica em seus



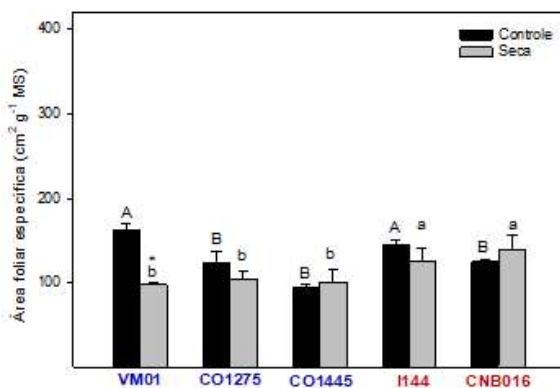
**Figura 1** – Arquitetura da copa de cones tolerantes (VM01, CO1275 e CO1445) e clones sensíveis (I144 e CNB016) em condições controle (A, C, E, G e I) e sob seca moderada (B, D, F, H e J).

caules, atuando como fusíveis hidráulicos que visam proteger os órgãos mais “caros” para as plantas de danos oriundos da seca (Tyree & Sperry, 1988). A porcentagem de espaço intercelular foi reduzida nos clones VM01, CO1445 e I144 em plantas submetidas à seca moderada em comparação à condição controle (Figura 4). Sob condições de seca moderada, menor porcentagem de espaço intercelular foi observada nos

clones VM01, CO1275 e CO1445 em comparação aos demais clones (clones sensíveis), na mesma condição. É importante destacar que clones em condições controle como VM01, CO1275 e CO1445 apresentam menor porcentagem de espaço intercelular em condições normais, ressaltando que esta característica possibilitou discriminar os genótipos.

Além disso, neste trabalho foi possível notar que a plasticidade fenotípica, capacidade do indivíduo se moldar a determinado ambiente, foi observado em clones, como VM01. Comportamento que foi explicado por experimentos anteriores que mostram que esse clone, sob períodos curtos de seca não altera sua estrutura anatômica, enquanto sob seca prolongada essas modificações são observadas.

Modificações na AFE, espessura dos tecidos do mesófilo e espaços intercelulares, como observados em clones cultivados sob seca moderada, parecem ser um importante mecanismo em eucaliptos para lidar com o déficit hídrico. Reduções na AFE evidenciadas em clones considerados tolerantes sob seca estão, aparentemente, associadas à espessura e adensamento dos tecidos foliares. Alterações mais visíveis foram notadas nos clones tolerantes destacando-se VM01 e CO1445. O clone CO1445 sofreu reduções na espessura das epidermes superior e inferior, espessura do mesófilo e total, associadas a reduções do espaço intercelular indicando a presença de células menores, porém em maior número. Redução na espessura foliar associadas,



**Figura 2** – Impactos da seca moderada na área foliar específica em clones de eucalipto contrastantes quanto a tolerância à seca. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições controle, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob seca moderada e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre condições controle e seca moderada de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) de 4 repetições biológicas.



**Figura 3** – Imagens representativas de plantas controle (esquerda) e sob seca (direita) ao final do ciclo de estresse (SM, SS e RI) com 120 dias de tratamento. Clones em azul são tolerantes e em vermelho clones sensíveis. o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Valores representam média  $\pm$  EP (erro padrão) de pelo menos 4 repetições biológicas.

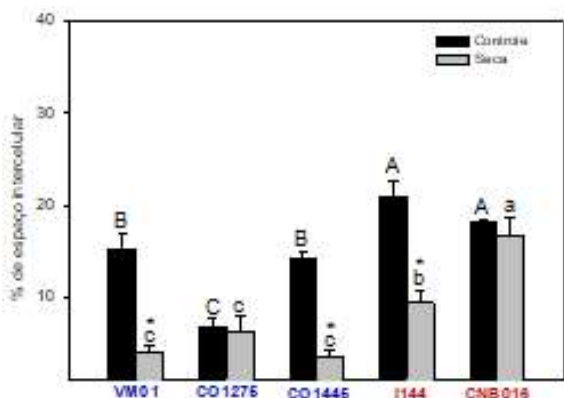
em larga escala, a redução de espaços intercelulares foi também notada em híbridos de *Trandescantia*,

estratégia essa que pode, todavia, comprometer a difusão de gases nos tecidos (Alves et al., 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

Plantas de eucalipto respondem diferentemente à intensidade e duração do estresse a qual são submetidas. E as características morfológicas e anatômicas são ótimas ferramentas para selecionar materiais genéticos contrastantes quanto a tolerância à seca.

Dessa forma, nota-se que a seca prolongada é responsável por desencadear modificações morfoanatômicas que possam ser responsáveis por conferir vantagens adaptativas aos genótipos mais tolerantes como o clone VM01. Além disso, materiais como VM01, CO1275 e CO1445 possuem mecanismos intrínsecos de tolerância à seca. As características estudadas neste trabalho poderão ser utilizadas por programas de melhoramento genético com o objetivo de facilitar o processo de seleção de genótipos mais adaptados, que serão mais aptos a tolerar condições de restrição hídrica.



**Figura 4** – Impactos da seca moderada na porcentagem de espaços intercelulares em clones de eucalipto. Letras maiúsculas denotam diferenças significativa comparando os clones sob condições controle, letras minúsculas denotam diferenças significativas comparando os clones sob seca moderada e asteriscos denotam diferenças significativas comparando cada clone entre condições controle e seca moderada.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJA (2001) Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição área urbana. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, V.24, n.4 (suplemento), p.567-576.
- Amrutha S, Parveen ABM, Muthupandi M, Sivakumar V, Nautiyal R, Dasgupta MG (2019) Variation in morpho-physiological, biochemical and molecular responses of two *Eucalyptus* species under short-term water stress. *Acta Botanica Croatica* 78: 125- 134.
- Brodribb TJ, Cochard H (2009). Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant physiology*. 149(1):575-84.
- Bryant C, Fuenzalida TI, Brothers N, Mencuccini M, Sack L, Binks O, Ball MC (2021) Shifting access to pools of shoot water sustains gas exchange and increases stem hydraulic safety during seasonal atmospheric drought. *Plant Cell and Environment* 44: 2898–2911
- Boer HJde, Drake PL, Wendt E, Price CA, Schulze ED, Turner NC, Nicolle D, Veneklaass EJ (2016) Apparent overinvestment in leaf venation relaxes leaf morphological constraints on photosynthesis in Arid habitats. *Plant Physiology* 172: 2286-2299.
- Cardoso AA, Batz TA, McAdam AS (2020). Xylem embolism resistance determines leaf mortality during drought in *Persea americana*. *Plant Physiology*. 182(1):547-54.
- Cheng J, Chu P, Chen D, Bai Y, Niu S (2016) Functional correlations between specific leaf area and specific root length along a regional environmental gradient in Inner Mongolia grasslands. *Functional Ecology* 30: 985–997.
- Cohen I, Zandalinas SI, Huck C, Fritschi FB, Mittler R (2021) Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. *Physiologia Plantarum* 171: 66–76
- Correia B, Pintó-Marijuan M, Neves L, Brossa R, Dias MC, Costa A, Castro BB, Araújo C, Santos C, Chaves MM, Pinto G (2013) Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum* 150: 580-592.
- Das A, Rushton P, Rohila J (2017) Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max L.*) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. *Plants* 6: 21.
- Eremina M, Rozhon W, Poppenberger B (2016) Hormonal control of cold stress responses in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 797–810.
- Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, Sadia S, Nasim W, Adkins S, Saud S, et al (2017) Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–16
- Golldack D, Li C, Mohan H, Probst N (2013) Gibberellins and abscisic acid signal crosstalk: living and developing under unfavorable conditions. *Plant Cell Reports* 32: 1007–1016.
- Gomes LML. Características morfofisiológicas associadas à restrição hídrica em clones de eucalipto. 37 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- Gonçalves JL, Alvares CA, Rocha JH, Brandani CB, & Hakamada R (2017). *Eucalypt plantation management in regions with water stress*. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 79(3), 169-183.
- IPCC (2021) *Climate change 2021: The physical science basis*. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Otto MSG, Francisco JG, Gonsalez BT, Calvo LA, Mattos EM, Almeida M, Moral RA, Demétrio CGB, Stape JL & Oliveira RF (2017) Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid concentration, gas exchange, and leaf anatomy in *Eucalyptus* clones under drought stress and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 208.
- Poorter H, Niinemets U, Poorter L, Wright IJ, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist* 182: 565–588.
- Sperry JS, Tyree MT (1988). Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant physiology*.

88(3):581-7.

Tyree MT, Sperry JS (1988). Do woody plants operate

near the point of catastrophic xylem dysfunction caused by dynamic water stress? Answers from a model. Plant physiology. 88(3):574-80.