

FLANCER NOVAIS NUNES

**CRESCIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CLONES DE EUCALIPTO
INFLUENCIADOS PELO BORO E DÉFICIT 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
2010

FLANCER NOVAIS NUNES

**CRESCIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CLONES DE EUCALIPTO
INFLUENCIADOS PELO BORO E DÉFICIT HÍDRICO**

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

APROVADA: 28 de janeiro de 2010

Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Co-orientador)

Prof. Ivo Ribeiro da Silva

Pesq. Valdir Diola

Pesq. Juliana de Lanna Passos

Prof. Nairam Félix de Barros
(Orientador)

Ao nosso pai celestial

À minha esposa Ana Luiza e à minha filha Laura

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao DPS, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Nairam Félix de Barros, pelas críticas, sugestões, pelo empenho na realização deste trabalho, orientação e principalmente pela consideração;

Ao Prof. Marcelo E. Loureiro, pela prontidão, competência e pelos conselhos que foram fundamentais à execução deste trabalho;

Ao Prof. Roberto Ferreira de Novais, pelo incentivo, pela dedicação e pelos conselhos que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal;

Ao Prof. Ivo Ribeiro da Silva, pela prontidão e pelas sugestões fundamentais à conclusão deste trabalho;

Aos Doutores Juliana de Passos. Lanna e Valdir Diola pelas sugestões e, principalmente, pela amizade;

À Purdue University e ao Department of Horticulture and Landscape Architecture, pelo acolhimento durante a realização do Doutorado Sandwich, em especial ao professor David E. Salt.

Aos amigos Ignacio, Juliana, Carol e Letícia pela contribuição com a montagem, execução e análises laboratoriais;

Aos colegas do curso de pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, especialmente ao Fabrício, Leonardus, Guilherme e Michelle pela amizade e companheirismo;

Aos funcionários do DPS, principalmente ao Beto, Cardoso, Carlinhos, Carlos, Cláudio, João Milagres, Luciana, Sonia e Zé Luis pela presteza e amizade;

A todos que participaram dos bons momentos que tive nessa jornada.

BIOGRAFIA

FLANCER NOVAIS NUNES, filho de Julio César Nunes e Sara Novais Nunes, nasceu em Patos de Minas, em 24 maio de 1977.

Em março de 2003, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 2003, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do professor Reinaldo Bertola Cantarutti, terminando-o em 13 de dezembro de 2005.

Em Março de 2006 iniciou o Curso de Doutorado na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de fertilidade do solo e nutrição de plantas, terminando-o em 28 de janeiro de 2010.

Em 2009, realizou o Doutorado Sandwich na University of Purdue, Indiana-EUA

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – Discriminação Isotópica de Carbono e Tolerância Diferencial de Clones de Eucalipto a Déficit Hídrico.....	4
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	8
Resultados e Discussão.....	11
Conclusões.....	16
CAPÍTULO 2 – Boro Aumenta o Crescimento de Mudanças de Clones de Eucalipto Submetidos ao Déficit Hídrico.....	17
Resumo	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	21
Resultados e Discussão.....	23
Conclusões.....	30
CAPÍTULO 3 – Expressão Gênica em Clones de Eucalipto Influenciada pelo Suprimento de Boro, Déficit Hídrico	31
Resumo	31

Abstract.....	33
Introdução	34
Material e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	42
Conclusões	55
Referências Bibliográficas	56
CONCLUSÕES GERAIS.....	63
Apêndice	64

RESUMO

NUNES, Flancer Novais, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2010. **Crescimento e expressão gênica em clones de eucalipto influenciados pelo boro e déficit hídrico.** Orientador: Nairam Félix Barros. Co-orientadores: Marcelo Ehlers Loureiro e Roberto Ferreira de Novais

A implantação de eucaliptais em regiões de cerrados tem levando a necessidade da seleção de clones de eucalipto tolerantes ao déficit hídrico, principal limitante à produtividade das plantas nessas áreas. Entre as desordens nutricionais relacionadas com micronutrientes, as que envolvem o B são as mais comuns, acarretando adubações frequentes com esse micronutriente. Na época seca do ano, sintomas de deficiência de B são mais comuns, pois, com a diminuição do conteúdo de água do solo, há diminuição de seu transporte à superfície das raízes, acarretando menor absorção. Adicionalmente o B parece estar relacionado a mecanismos fisiológicos que propiciam tolerância ao déficit hídrico, como por exemplo: aumento da relação raiz:parte aérea; assim o B ou água apresentam sinergismo entre si. Os objetivos desse trabalho foram: avaliar a relação da $\delta^{13}\text{C}$ entre clones de eucalipto sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico; verificar a influência da fertilização com B em clones de eucalipto, cultivados sem ou com restrição hídrica, na tolerância ao déficit hídrico e no padrão de transcrição de gênica. Para atender ao primeiro objetivo, talhões com quatro anos de idade, com clones de *Eucalyptus urophylla* sensível (3334) ou tolerante (3335) ao déficit hídrico foram selecionados, ao fim da estação seca, nos municípios de Brasília de Minas e Bocaiúva. Foi determinado em cada talhão o potencial hídrico foliar, $\delta^{13}\text{C}$, índice de sobrevivência e produtividade. Para atender ao segundo objetivo, mudas dos clones 3334 e 3335 foram submetidas aos seguintes tratamentos: sem ou com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B e sob potencial hídricos de -0,05 ou -1,5 MPa. Após período de 10 dias amostras de folhas e raízes, contendo aproximadamente 1 g, foram coletadas para extração de RNA e, depois, as plantas foram divididas em folha, caule e raiz para determinação da produção de matéria seca e do teor de B. Por ocasião da coleta também foi determinado o potencial hídrico foliar (Ψ_{wl}), fotossíntese, condutância estomática e transpiração. Foram selecionados quatro genes relacionados ao transporte de B e polióis, e outros quatro relacionados à síntese de parede celular, sendo estes detectados por meio RT-PCR. O clone tolerante ao déficit hídrico apresentou menor $\delta^{13}\text{C}$, menor Ψ_{wl} e maior índice de sobrevivência.

Adicionalmente, não houve diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre árvores cultivadas nos dois municípios. Estes resultados sugerem que a $\delta^{13}\text{C}$ poderia ser utilizada como indicador de genótipos tolerantes à seca em árvores cultivadas sob restrições hídricas. A disponibilidade de água foi o fator que mais influenciou a produção de matéria seca nos dois clones. A adição de B à solução nutritiva propiciou maior produção de matéria seca pela parte aérea, fotossíntese, condutância estomática e transpiração. Houve aumento mais expressivo na produção de matéria seca pelo clone tolerante, em razão da adição de B, sugerindo que a adição deste nutriente poderia contribuir para maior tolerância à seca. Tanto os genes relacionados ao transporte de B e polióis quanto os relacionados à síntese de parede celular apresentaram maior expressão relativa nos tecidos radiculares do clone tolerante - cultivado sob déficit hídrico, na presença de B. Sugere-se que os genes das duas classes estão envolvidos na síntese de parede celular nas plantas: primeiro, a maior expressão de transportadores de polióis contribui com o suprimento de carbono; segundo, os transportadores de B vão propiciar adequado suprimento desse nutriente, responsável pela dimerização dos compostos pécticos da parede celular; e terceiro, efeito direto da maior expressão dos genes relacionados à síntese de parede celular. Salienta-se que os genes apresentaram maior expressão relativa na raiz, sinalizando maior crescimento do sistema radicular; estratégia para maior aquisição de nutrientes e água, contornando problemas causados por longos períodos de estiagem.

ABSTRACT

NUNES, Flancer Novais, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January of 2010.
Growth and gene expression in eucalypt clones affected by water stress and boron supply. Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Marcelo Ehlers Loureiro and Roberto Ferreira de Novais

The increasing of the eucalypt plantation in the Cerrado region in Brazil has increasing the need to develop eucalypt clones tolerant to water stress, the main limiting factor to tree productivity in this region. Water deficit also induce B deficiency in eucalypt trees growing in these region, leading to frequent B fertilizations. During the dry season, B deficiency symptoms are more common, because the low soil water content leads to a reduced B transport rate through the soil, and, also, to a lower B uptake. Boron has been related to physiological mechanisms which provide higher plant drought tolerance, as, for example: higher root:shoot relation; thus, water and B have a synergistic effect. The objectives of this study was: 1) to evaluate the relationship between carbon isotope discrimination ($\delta^{13}\text{C}$) and drought tolerance in eucalypt clones; 2) to verify the influence of B availability for eucalypt clones, cultivated under restricted water availability, on water stress and gene transcription pattern. For the first objective eucalypt stands of *Eucalyptus urophylla* clones, one sensible (3334) and the other tolerant (3335) to water stress, with four years of age, growing in Brasília de Minas e Bocaiúva counties – Minas Gerais State –, were selected at the end of the dry season of 2007. We evaluated leaf water potential (Ψ_{wl}), $\delta^{13}\text{C}$, plant survival index and stem productivity. For the second objective, seedlings of the 3334 and 3335 clones, were submitted to the absence or presence of $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ of B and to the water potentials of -0,05 and -1,5 MPa. Ten days after treatment application, 1 g of leaf and root samples were collected for RNA extraction, and, then, the plants were separated in leaf, stem and root to determine the dry matter production. At the harvesting time, leaf water potential, photosynthesis, stomata conductance and transpiration rate were determined. Four genes related to B and polyol transport and four genes related to cell wall synthesis were selected, and analyzed by RT-PCR. The tolerant clone presented smaller $\delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{wl} than the sensible one, and higher survival index. There was no difference in the $\delta^{13}\text{C}$ values between trees of the same clone cultivated in the two

countries. The results suggest that $\delta^{13}\text{C}$ can be used as an indicator of drought tolerance for eucalypt clones when cultivated under water restriction. The water availability was the main factor affecting biomass production in both clones. Boron application improved shoot biomass production, photosynthesis, stomata conductance and transpiration rate. Shoot dry mass production by the tolerant clone was higher, when B was added, as compared to absence of B, suggesting that this micronutrient improved drought tolerance. The genes related to B and polyol transport, and those related to cell wall synthesis, presented higher relative expression in roots tissue of the tolerant clone, cultivated under water stress, on B presence. It is suggested that both gene classes are involved in cell wall synthesis: first, higher polyol transporter gene expression provide carbon source; second, B transporters will provide adequate B supply to polymerization of pectin compounds; and thirty, the direct effect of higher gene expression of the genes related to cell wall syntheses We pointed that all of the genes presented higher relative expression in the root, signaling for higher root system development, a strategy that contributes to a higher water and nutrient acquisition, overcoming problems related to a long drought period.

INTRODUÇÃO GERAL

A expansão de florestas plantadas vem decorrendo principalmente em áreas de cerrado, conhecidas por apresentarem acentuada restrição hídrica e nutricional. Apesar dessas características, o custo relativamente baixo dessas terras e suas excelentes propriedades físicas e topográfica, transformam-nas em ótimas opções para implantação de florestas. Todavia, o suprimento de água e nutrientes, principais fatores abióticos que alteram o crescimento de plantas nessas áreas, é problema freqüente. Para contornar esses problemas as empresas florestais atualmente têm buscado por genótipos tolerantes a seca e com maior eficiência de utilização de nutrientes, especialmente, B.

Existe grande diferença de adaptação entre materiais genéticos de eucalipto plantados na região do cerrado. No que tange a disponibilidade d'água, a diferença de crescimento seria explicada por mecanismos envolvidos na aquisição e, ou, reduzem a perda ou aumentam a eficiência de sua utilização. Para nutrientes, mecanismos que aumentam tanto a aquisição como sua eficiência de utilização seriam os responsáveis por essa diferença. Para as plantas manterem boa taxa de crescimento em solos de baixa fertilidade, devem apresentar mecanismos que aumentem a eficiência de absorção de nutrientes, tais como, maior crescimento do sistema radicular, associações micorrízicas, modificação da rizosfera para aumentar a disponibilidade de nutrientes e, principalmente, maior eficiência de utilização do nutriente absorvido, por uma redistribuição mais efetiva (Marschner, 1986; Good et al., 2004; Nunes et al., 2008).

O principal sintoma visual da deficiência de B em plantas de eucalipto é a seca de ponteira, esse sintoma é associado a períodos secos e sua intensidade depende do material genético. Na fase inicial a deficiência de B é caracterizada por folhas jovens menores e deformadas, progredindo para aspecto coriáceo e bordas amareladas, tornando-se quebradiças e encarquilhadas. Finalmente, esse processo culmina com a morte dos meristemas e, conseqüentemente, com perda da dominância apical (Dell & Malajczuk, 1994). Em períodos ou em locais extremamente secos as árvores de eucalipto podem, ainda, morrer por desidratação, a exemplo do que se observou em muitas áreas do norte de Minas Gerais no ano de 2007.

Nos cerrados, a seca de ponteiros é mais intensa nos anos mais secos, produzindo perdas, que vão desde perda da dominância apical, comprometendo o uso da

madeira para produtos sólidos. A adubação com B e K pode reduzir a intensidade deste problema, embora as observações ainda sejam empíricas, desconhecendo-se as razões para o comportamento diferenciado de clones. A morte do meristema das gemas apicais é um sintoma típico de deficiência de boro. Por outro lado, o K é o principal nutriente responsável pelo controle das taxas transpiracionais nas plantas. A variabilidade fenotípica observada no germoplasma disponível nas empresas do setor florestal indica a possibilidade de fazer a seleção de clones com maior tolerância à seca e/ou menor susceptibilidade à seca dos ponteiros. Os motivos pelos quais haveria diferenças genotípicas na intensidade da seca dos ponteiros poderiam ser explicados por diferentes hipóteses: 1) Diferenças na nutrição do boro (absorção, transporte, e redistribuição); 2) Diferenças na tolerância ao estresse hídrico associadas a uma diferente arquitetura radicular retardando o declínio da taxa evapotranspiratória e do nível de transporte de B (aplicação de B foliar estimularia o crescimento radicular, propiciando maior absorção de água e desse nutriente pelas plantas); 3) Diferenças genotípicas no tipo e nível de alcoóis-açúcar produzidos em resposta ao déficit hídrico relacionadas; 4) Diferenças na composição e teor da fração pectínica ou no metabolismo da mesma em resposta ao déficit hídrico; 5) Diferenças na alocação e partição de carbono alterando a absorção de água e B, trocas gasosas e a tolerância à seca.

Tanto a tolerância à seca como a eficiência para o uso do B são heranças quantitativas, cada uma delas governada por um número variado de genes, dependendo do genótipo (Araus et al., 2002; Zeng et al., 2007). A manifestação fenotípica destes caracteres multi-gênicos tem forte influência ambiental, sendo de difícil avaliação e melhoramento.

Estudos de adaptação de clones de eucalipto ao déficit hídrico têm se restringido a avaliar o crescimento e a produtividade das plantas em ambientes com limitada disponibilidade hídrica, sem se preocupar em identificar os mecanismos que conferem maior tolerância a esse déficit. Assim, a seleção de clones mais produtivos, geralmente com maior demanda hídrica e nutricional pode, em alguns casos, ter impacto econômico negativo, como recentemente observado em alguns povoamentos no norte de Minas Gerais, onde se constatou grande mortalidade de plantas em razão da forte seca observada em 2007. Visto que a herança das características relacionadas à maior tolerância ao déficit hídrico é poligênica, a avaliação de genótipos utilizando critérios de seleção baseado em poucas características pode comprometer seriamente a eficiência deste processo de seleção genética. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi

verificar os mecanismos moleculares e fisiológicos que governam a tolerância ao déficit hídrico, em resposta a disponibilidade de B em clones de eucalipto visando a elaboração de estratégia de seleção de clones de eucalipto tolerantes.

Capítulo 1 – Discriminação Isotópica de Carbono e Tolerância Diferencial de Clones de Eucalipto ao Déficit Hídrico

Resumo: O setor florestal brasileiro está em franca expansão dada a crescente implantação de eucaliptais na região do Cerrado. Nessas áreas, a baixa disponibilidade de água é o principal limitante à produtividade das florestas plantadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a relação entre discriminação isotópica do ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) e a tolerância ao déficit hídrico de clones de eucalipto. Plantios com espaçamento entre plantas de 3 x 3, 3 x 4 e 4 x 6 m, no município de Brasília de Minas, e de 3 x 3, 3 x 6 e 4 x 6 m, no município de Bocaiúva, com quatro anos de idade, com clones de *Eucalyptus urophylla*, sensíveis (3334) ou tolerantes (3335) ao déficit hídrico, foram selecionados, no fim da estação seca de 2007 - a mais seca dos últimos anos. Foi determinado o potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) e $\delta^{13}\text{C}$ - apenas nos talhões com espaçamento de 3 x 3 m. Passados dois anos foram determinados, em todos os espaçamentos, o índice de sobrevivência de plantas, produtividade de madeira total, por plantas vivas e mortas, e produtividade por plantas vivas. O clone tolerante ao déficit hídrico apresentou menor $\delta^{13}\text{C}$ e Ψ_{wf} , que o sensível. O clone tolerante apresentou maior índice de sobrevivência de plantas associado à menor $\delta^{13}\text{C}$. De modo geral, com o aumento do espaçamento entre plantas houve diminuição da produtividade do clone tolerante e do sensível, em ambas as localidades. Os resultados sugerem que a $\delta^{13}\text{C}$ pode ser utilizada como indicador de clones de eucalipto tolerantes ao déficit hídrico quando cultivados sob restrições hídricas.

Chapter 1 – Carbon isotope discrimination and differential drought tolerance in eucalypt clones

Abstract: Plantation forest in Brazil has steadily increasing in the last ten year, with new areas being planted mainly in the Cerrado regions. In these areas, the water availability is known to be the main limitation to planted forest productivity. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship between carbon isotope discrimination ($\delta^{13}\text{C}$) and drought tolerance in eucalypt clones. Stands of *Eucalyptus urophylla* natural clones, four years of age, growing in two counties in the North Region of the state of Minas Gerais, characterized by long dry season, where selected for the study. In Brasilia de Minas county, trees were spaced 3x3, 3x4 and 4x6 m, and in Bocaiúva county spaced 3x3, 3x6 and 4x6 m. In both counties two clones, one considered sensible (3334) and other (3335) tolerant to water stress, were characterized at the end of the dry season of 2007 – the driest one lately. We evaluated leaf water potential (Ψ_{wl}) and $\delta^{13}\text{C}$ – on sites with 3x3 m tree spacing only. Two years later, were determined, for all tree spacing, plant survival index and stem volume of dead and living trees. The tolerant clone presented smaller $\delta^{13}\text{C}$ and Ψ_{wl} than the sensible one, and higher survival index. This was associated to smaller $\delta^{13}\text{C}$. In general, increasing tree spacing lead to smaller wood productivity for the tolerant and sensible clones in both areas. The results suggest that the $\delta^{13}\text{C}$ can be used as an indicator of drought tolerance for eucalypt clones when cultivated under water restriction.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos florestais, como carvão e celulose, tem levado à expansão de áreas com florestas plantadas, em mais de um milhão de hectares nos últimos cinco anos. Essa expansão acontece, principalmente, pela implantação do eucalipto em regiões de Cerrado com severas limitações hídricas. Observou-se recentemente a morte diferencial de clones de eucalipto em algumas regiões em razão do forte déficit hídrico, decorrente de oito meses sem chuva. Extensas áreas cultivadas com certos clones de eucalipto foram devastadas pela seca enquanto outras, adjacentes, aparentemente não apresentaram problema algum.

O déficit hídrico é conhecido por ser um dos principais limitantes à produtividade do eucalipto, mesmo em áreas consideradas favoráveis ao bom crescimento e desenvolvimento das florestas (Honeysett et al., 1992). Embora a redução da taxa de crescimento, em condições de baixa disponibilidade hídrica, seja considerada a principal causa da menor produtividade florestal, a sobrevivência das florestas também é importante componente do problema (Chambers & Borralho, 1997).

Diferentes processos fisiológicos podem estar envolvidos nesse problema como ajustamento osmótico, maior relação raiz:parte aérea, menor condutância estomática dentre outros. O fechamento dos estômatos pode favorecer a manutenção da hidratação dos tecidos e, por outro lado, reduzir a produtividade. Contudo, há genótipos que permitem abertura parcial dos estômatos, evitando perda excessiva de água associada à manutenção da concentração interna de CO₂ e, conseqüentemente, da taxa fotossintética - mecanismo que confere maior eficiência de utilização de água (EUA) (Condon et al., 2004). Assim, clones de eucalipto com maior EUA apresentam menor requerimento de água por unidade de matéria seca produzida.

A discriminação isotópica do ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) tem sido utilizada como critério de seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, por correlacionar com a eficiência de utilização de água pelas plantas (Li, 2000; Impa et al., 2005; Monneveux et al., 2007; Ducrey et al., 2008). DaMatta et al. (2003), trabalhando com café conilon, observaram que clones tolerantes apresentaram menor condutância estomática e menor $\delta^{13}\text{C}$, concomitante à manutenção de maior área foliar e do potencial hídrico da folha.

Todavia, processos fisiológicos envolvidos na adaptação ao estresse hídrico desses clones ainda não são conhecidos.

O estabelecimento das relações entre taxa fotossintética e condutância estomática com $\delta^{13}\text{C}$ e EUA (Farquhar et al., 1989) propiciou a utilização da $\delta^{13}\text{C}$, medida mais simples do que a da EUA, com ferramenta na seleção de genótipos com maior tolerância ao déficit hídrico. Vários experimentos de campo e em condições controladas também indicaram a utilização da $\delta^{13}\text{C}$, como uma indicação da EUA, na seleção de genótipos mais tolerantes ao déficit hídrico (Read et al., 1991; Sheshshayee et al., 2003; Condon et al., 2004; Ducrey et al., 2008). Adicionalmente, a $\delta^{13}\text{C}$ propicia medida integrada das propriedades fisiológicas das plantas, durante seu ciclo, principalmente, da taxa fotossintética e da condutância estomática, em relação às condições ambientais (Anderson et al., 1996). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a $\delta^{13}\text{C}$ de clones de eucalipto sensíveis ou tolerantes ao déficit hídrico e, também, sua utilização na seleção de genótipos mais eficientes em condições de baixa disponibilidade de água.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas florestas de eucalipto com quatro anos de idade, localizadas nos municípios de Brasília de Minas e Bocaiúva, com clones de eucalipto que apresentaram tolerância diferencial ao déficit hídrico acentuado que ocorreu na estação seca de 2007. Essas florestas foram implantadas no final do ano de 2003 e não apresentaram problemas relacionados ao déficit hídrico até o início do ano de 2007, ano que correu a seca mais prolongada dos últimos anos. Nesse ano a precipitação pluvial no período de abril a novembro foi insignificante, com oito meses com forte restrição hídrica (Figura 1). Plantas de talhões com clones sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico foram selecionadas, com base em sintomas visuais (seca das árvores da base para o ápice), ao final da estação seca em áreas experimentais da Plantar Reflorestamentos (Figura 2).

Nessas áreas experimentais, localizadas no norte de Minas Gerais, onde se estudava o espaçamento de plantio, foram utilizados talhões com espaçamento de 3 x 3, 3 x 4 e 4 x 6 m (9, 12 e 24 m² por planta), em Brasília de Minas, enquanto em Bocaiúva foram utilizados os espaçamentos de 3 x 3, 3 x 6 e 4 x 6 m (9, 18 e 24 m² por planta) – todos os talhões eram cultivados com dois clones de *Eucalyptus urophylla*, sendo eles com características de sensível (clone 3334) ou tolerante (clones 3335) ao déficit hídrico. Em cada um desses municípios, ao final da estação seca, novembro de 2007, foi selecionado um talhão - espaçamento de 9 m² por planta (3 x 3 m) - com o clone sensível e outro com o tolerante para coleta de amostras de tecidos da planta. Em cada talhão, foram selecionadas quatro árvores sem sintomas visuais de déficit hídrico, perfazendo quatro repetições.

As árvores selecionadas foram abatidas no período entre 12:00 e 14:00 h e a terceira ou quarta folha de ramos apicais foi coletada em quatro galhos do terço médio de cada árvore, para determinação do potencial hídrico com bomba de pressão tipo Scholander. O potencial hídrico da folha de cada árvore foi composto pela média de quatro leituras. Em seguida, foram coletadas, em cada árvore, amostras de lenho e folha (terceira ou quarta folha completamente expandida). Essas amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 72 °C até atingirem peso constante e moídas para determinação da $\delta^{13}\text{C}$.

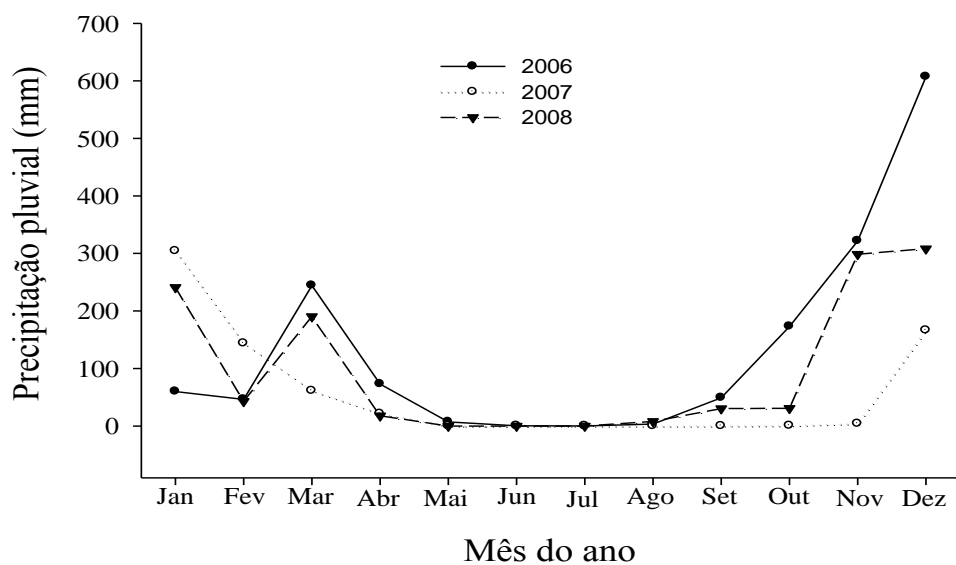


Figura 1. Precipitação pluvial média para a região de Brasília de Minas e Bocaiúva (MG) para os anos 2006, 2007 e 2008.

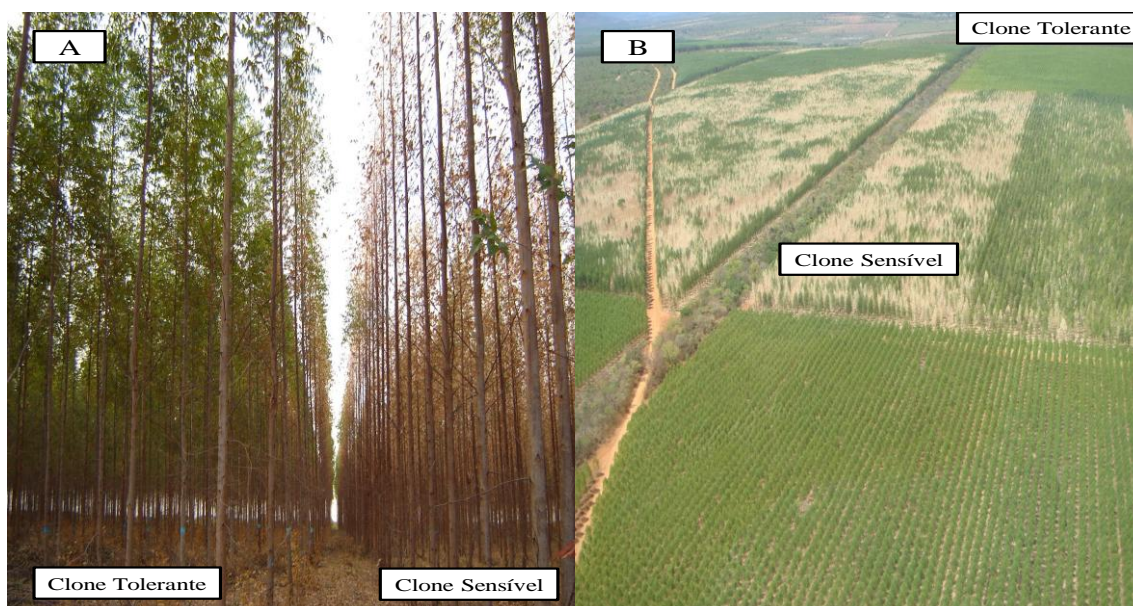


Figura 2. Áreas experimentais da Plantar Reflorestamento em Brasília de Minas (A) e em Bocaiúva (B). Imagem tomada na divisa entre talhões com o clone sensível e o tolerante ao déficit hídrico (A) e imagem aérea ilustrando o mosaico composto por árvores mortas e vivas (B). A presença de árvores mortas, embora em menor número, também foi observada no talhão com o clone tolerante em Brasília de Minas.

A $\delta^{13}\text{C}$ foi determinada em relação ao padrão internacional PDB (*Pee Dee Belemnite*), utilizando-se espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA-GLS, Sercom, Crewe, UK), conforme descrito por Li et al. (2000).

A produtividade de madeira por árvores vivas e árvores mortas (produtividade total), a produtividade por plantas vivas e o índice de sobrevivência, para cada espaçamento de plantio, foram determinados em março de 2009, seis anos e quatro meses após o plantio das florestas. O índice de sobrevivência foi calculado pela percentagem das plantas vivas em relação ao total de árvores (vivas mais mortas) de cada talhão.

Os dados foram analisados de acordo com delineamento inteiramente casualizado. Os efeitos das variáveis controle foram submetidos à análise de variância e, quando necessário, submetidos ao teste de Tukey a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado menor valor de potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}), no clone tolerante ao déficit hídrico, em Brasília de Minas, quando comparado aos valores observados no mesmo clone em Bocaiúva (Quadro 1), sugerindo que em Bocaiúva, pelo menos no momento em que as amostras foram coletadas, havia menor restrição hídrica. Isso pode ter sido em decorrência de menor demanda atmosférica - déficit na pressão de vapor, por exemplo - visto que o potencial hídrico do solo, para a camada de 0 - 1,6 m, foi similar em ambas as localidades; média de -1,68 e -1,66 MPa para Brasília de Minas e Bocaiúva, respectivamente. O clone tolerante ao déficit hídrico apresentou Ψ_{wf} menor (mais negativo), sendo as maiores diferenças observadas na área de Brasília de Minas (Quadro 1). Este resultado, menor Ψ_{wf} para o clone tolerante, não era esperado, visto que os mecanismos que favorecem maior tolerância das plantas ao déficit hídrico, como menor condutância estomática, estão relacionados com a manutenção maiores valores de Ψ_{wf} (DaMatta et al., 2003).

Os menores valores de Ψ_{wf} observados no clone tolerante a seca, em Brasília de Minas, coincidiram com maiores valores de $\delta^{13}C$ (Quadro 1). Resultados semelhantes foram observados por Yin et al. (2009) que verificaram que condições que favoreciam melhor controle transpiracional das plantas cultivadas em condições de limitada disponibilidade de água, contribuiriam para maior valor de $\delta^{13}C$ e menor conteúdo de água nos tecidos foliares de duas espécies florestais, *Populus cathayana* e *P. przewalskii*. Esses resultados contrariam a literatura sobre o assunto, indicando que a menor Ψ_{wf} acarreta menores taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, maior discriminação isotópica, ou seja, valores de $\delta^{13}C$ mais negativos. (DaMatta et al., 2003; Monneveux et al., 2007; Ducrey et al., 2008).

Não houve diferenças significativas entre os valores de $\delta^{13}C$ de amostras de folha e lenho (Quadro 1), indicando que a $\delta^{13}C$ em amostras de folha ou lenho pode ser utilizada como ferramenta na seleção de clones mais tolerantes ao déficit hídrico. Plantas com melhor controle estomático e maior eficiência de utilização de água (EUA) são, de modo geral, mais bem adaptadas a condições de baixa disponibilidade de água. Neste contexto, correlação positiva entre EUA e valores de $\delta^{13}C$ tem sido observada (Li

Quadro 1. Discriminação isotópica do ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) em amostras de folha e lenho de clones sensível e tolerante ao estresse hídrico coletados em plantios com quatro anos de idade nas cidades de Brasília de Minas e Bocaiúva.

Clone	Ψ_w	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
	MPa	Folha	Lenho
Brasília de Minas			
Tolerante	-2,00Aa	-26,16Aa	-26,27Aa
Sensível	-1,40Ba	-27,27Ba	-27,36Ba
Bocaiúva			
Tolerante	-1,40Ab	-26,28Aa	-26,86Aa
Sensível	-1,20Aa	-27,53Ba	-27,33Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, dentro de cada localidade (comparando o efeito dos clones), e pela mesma letra minúscula, dentro de cada clone (comparando o efeito da localidade) não diferem entre si pelo teste F a 5 %.

et al., 2000). Clones mais tolerantes a déficit hídrico apresentaram maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$, ou seja, menor discriminação do ^{13}C , nas amostras de folha e lenho (Quadro 1). Nas plantas C_3 , a $\delta^{13}\text{C}$ é decorrente da menor taxa de difusão do ^{13}C , mais pesado, que o ^{12}C , causando discriminação de aproximadamente -4,4 ‰ e, também, da menor afinidade da rubisco pelo ^{13}C , causando discriminação final de aproximadamente -28 ‰. Porém, em condições onde a concentração interna de CO_2 é reduzida pela menor abertura dos estômatos, como nas horas mais quentes do dia, e a taxa fotossintética é mantida, há menor discriminação do ^{13}C em relação ao ^{12}C pela rubisco, reduzindo a $\delta^{13}\text{C}$. Desta forma, variações na $\delta^{13}\text{C}$ podem decorrer de mudanças na taxa de carboxilação ou da condutância estomática. Supondo que a taxa fotossintética nos clones sensível e tolerante são semelhantes, a menor $\delta^{13}\text{C}$ no clone tolerante sinaliza para melhor controle estomático, mantendo maior taxa fotossintética, mesmo com menor condutância estomática. Isso indica que o clone tolerante apresenta estratégia de utilização de água mais conservativa, como sugerido por Li (2000).

O clone tolerante, em condições de déficit hídrico, apresentou maior índice de sobrevivência como esperado (Figura 3), juntamente com menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ (Quadro 1). Na localidade de Brasília de Minas, o clone tolerante, com espaçamento de 3 x 3 m, apresentou $\delta^{13}\text{C}$ de -26,28 ‰ e índice de sobrevivência de 82,3 %, enquanto o clone sensível apresentou -27,34 ‰ e 16,8 %, respectivamente. Esses resultados reforçam a hipótese de que clones resistentes apresentam menor condutância estomática associada

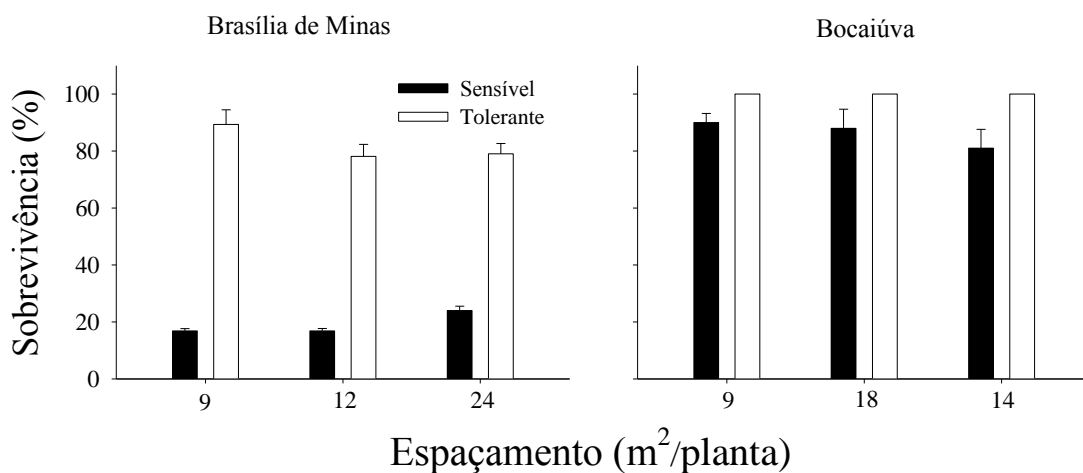


Figura 3. Índice de sobrevivência dos clones de eucalipto sensível e tolerante ao estresse hídrico em razão do espaçamento, em florestas com cinco anos de idade, nas cidades de Brasília de Minas e Bocaiúva. Cada barra representa media de quatro repetições com respectivo erro padrão.

à manutenção da taxa fotossintética, contribuindo para menor discriminação isotópica. Resultados contrários aos encontrados neste estudo são reportados por Pita et al. (2001). Esses autores encontraram correlação negativa entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e sobrevivência de árvores, sugerindo que a composição isotópica do C não é um bom indicador da adaptabilidade de árvores a condições com déficit hídrico.

Os valores de sobrevivência foram maiores em Bocaiúva (Figura 3). Isso se explica pelo menor déficit hídrico nessa localidade, que varia entre 200 e 250 mm ano⁻¹, enquanto em Brasília de Minas esses valores variam em entre 300 a 350 mm ano⁻¹. Curiosamente, não houve diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre as localidades estudadas, independentemente do material genético (Quadro 1), sugerindo que esta característica apresenta baixa interação entre genótipo e ambiente. Todavia, como já discutido, houve diferença significativa para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre os clones sensível e o tolerante ao déficit hídrico, indicando que a $\delta^{13}\text{C}$ pode ser utilizada como ferramenta na seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico, por ser uma característica genotípica. Confirmado essa premissa, Impa et al. (2005) sugerem que a $\delta^{13}\text{C}$, bem como a EUA, são características que sofrem baixa interferência ambiental.

Os dois clones apresentaram menor produtividade nas condições de maior espaçamento entre plantas, em Brasília de Minas (Figura 4). Porém houve redução drástica na produtividade por árvores vivas no clone sensível ao déficit hídrico, dado o

baixo índice de sobrevivência deste clone após a severa estação seca que antecedeu a coleta de material (Figura 3 e 4). Observou-se maior produtividade de madeira e menor $\delta^{13}\text{C}$ tanto em Brasília de Minas quanto em Bocaiúva (Figura 4, Quadro 1). Em Bocaiúva, por exemplo, o clone tolerante apresentou produtividade de $191 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ e $\delta^{13}\text{C}$ na folha de $-26,28 \text{ ‰}$ enquanto o sensível apresentou $141 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ e $\delta^{13}\text{C}$ de $-27,53 \text{ ‰}$. A correlação positiva entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e produtividade também foi reportada em outros trabalhos (Zhang et al., 1994; Stiller et al., 2005), e podem ser decorrentes de menor condutância estomática associada a manutenção da taxa fotossintética pelo clone tolerante (Ducrey et al., 2008). Isso sugere que o este clone tem mecanismos que propiciam maior eficiência transpiracional e, conseqüentemente, maior produtividade que o clone sensível quando cultivados em áreas com severo déficit hídrico.

Desta maneira, com base nos dados de $\delta^{13}\text{C}$ e índice de sobrevivência, tanto em Brasília de Minas como em Bocaiúva, e na literatura disponível (Li, 2000; Condon et al., 2004; Impa et al., 2005; Monneveux et al., 2007), sugere-se a $\delta^{13}\text{C}$ como indicador de clones de eucalipto mais tolerantes a déficit hídrico.

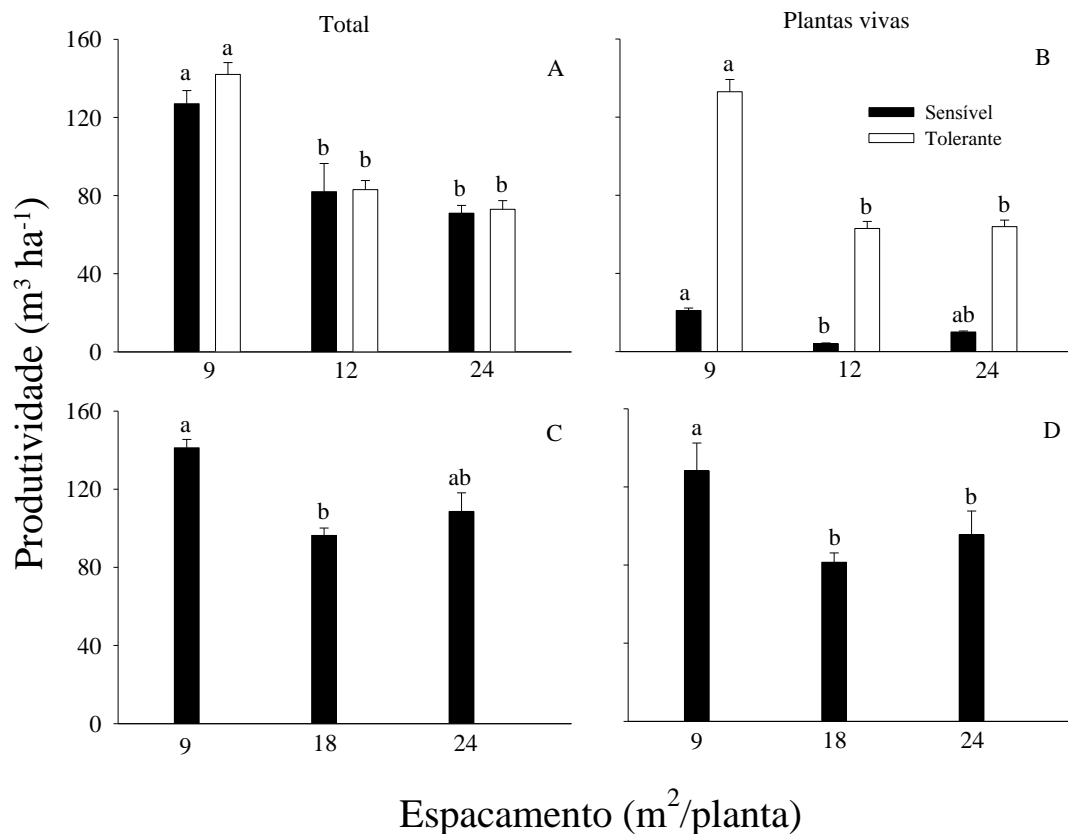


Figura 4. Produtividade total de madeira ($\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$), soma da produção das plantas vivas e mortas (A e C), e produtividade por plantas vivas (B e D) para os clones de eucalipto sensível e tolerante ao estresse hídrico em razão do espaçamento de plantio nas cidades de Brasília de Minas (A e B) e Bocaiúva (C e D). Cada barra representa média de quatro repetições com respectivo erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando o efeito de espaçamento entre plantas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

CONCLUSÕES

1. Clones tolerantes ao déficit hídrico apresentam maiores valores de discriminação isotópica do ^{13}C , maior produtividade de madeira e menor índice de sobrevivência de plantas .
2. A discriminação isotópica do ^{13}C em árvores com quatro anos de idade pode ser utilizada como indicador de genótipos tolerantes ao déficit hídrico quando esse problema se estabelece.

Capítulo 2 - Boro Aumenta o Crescimento de Mudras de Clones de Eucalipto Submetidos ao Déficit Hídrico.

Resumo: O déficit hídrico é o principal limitante da produtividade de florestas plantadas na região de cerrados. Do ponto de vista nutricional, em condições de baixa disponibilidade hídrica, o B é o micronutriente que tem mais afetado o crescimento das árvores. Este micronutriente tem suas taxas de absorção afetada pelo conteúdo de água do solo e, sua deficiência, pode acarretar desordens metabólicas que agravam ainda mais os problemas decorrentes de longos períodos sob déficit hídrico. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência da disponibilidade de B na tolerância de clones eucalipto ao déficit hídrico. Mudras de dois clones de *Eucalyptus. urophylla*, um sensível e outro tolerante ao estresse hídrico, foram submetidos aos seguintes tratamentos: sem ou com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B e sob potencial hídrico de -0,05 ou -1,5 MPa. Dez dias depois de iniciado os tratamentos, amostras de folhas, caule e raízes foram coletadas, secadas, pesadas e moídas para determinação do teor de B. Por ocasião da coleta também foram determinados o potencial hídrico foliar, fotossíntese, condutância estomática e transpiração. A disponibilidade de água foi o fator que mais influenciou a produção de matéria seca dos clones, provocando redução de 1,85 vezes na produção de matéria seca da parte aérea quando o potencial hídrico da solução nutritiva foi reduzido para -1,5 MPa. A adição de B na solução nutritiva propiciou maior produção de matéria seca da parte aérea, fotossíntese, condutância estomática e transpiração. No clone sensível a adição de B propiciou, em média, aumento de 24 % na produção de matéria seca da parte aérea das plantas cultivadas sob déficit hídrico, enquanto no clone tolerante houve aumento de 50 %. O aumento mais expressivo na produção de matéria seca do clone tolerante, em razão da adição de B, sugere que a adição deste nutriente contribui para maior tolerância à seca.

Chapter 2 – Boron Increase the Seedlings Growth of Eucalypt Clones Cultivates under Water Stress

Abstract: The water stress is main limiting to planted forest production in the Cerrado area. Considering the nutritional aspects, under conditions of low water availability, B is the micronutrient that most affect tree growth. Boron uptake rate is negatively affected by low soil water content, which can induce B deficiency leading to metabolic disorders. Thus, the main objective of this work was verify the influence of B availability for eucalypt clones on water stress tolerance. Seedlings of two *Eucalyptus urophylla* clones, one sensible and the other one tolerant to water stress, were submitted to the absence or presence of $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ of B and to the water potentials of -0,05 and -1,5 MPa. Ten days after the treatments application, leaf, stem, and root samples were collected, dried, weighed and ground for B determination. At the harvesting time, leaf water potential, photosynthesis, stomata conductance and transpiration rate were determined. Water availability was main factor affecting biomass production in both clones, reducing shoot production by 1,85 times, when the water potential in the nutrient solution was reduced from 0 to -1,5 MPa. Boron application improved shoot biomass production, photosynthesis, stomata conductance and transpiration rates. Under water stress conditions, B application contribute to increase biomass production in both clones: 24 % in the sensible one and 50 % in the tolerant. The higher biomass production by the tolerant clone, under B presence, is an indicating that B application may have contributed to a higher drought tolerance.

INTRODUÇÃO

O B pode ser encontrado em várias formas na solução do solo. Contudo, para a faixa de pH entre 4,5 e 6,0, normalmente encontrada nos solos tropicais, o ácido bórico é sua principal forma. O fluxo em massa é a principal forma de transporte de B no solo, sendo, pois, seu transporte até à superfície das raízes altamente dependente do conteúdo de água do solo. Isso explica o agravamento dos sintomas de deficiência de B nos períodos secos do ano na maioria das plantas perenes. Sua deficiência é a mais comum entre os micronutrientes e é problema comum em mais de 80 países (Shorrocks 1997).

A redução do crescimento de regiões meristemáticas, caulinares e radiculares, é o principal distúrbio causado pela deficiência de B. Plantas cultivadas em condições de baixa disponibilidade de B apresentam menor alongamento de raízes, que se tornam mais grossas e curtas, e redução da produção de novas raízes (Marschner, 1986). Desta forma, condições de baixa disponibilidade desse micronutriente causam menor crescimento do sistema radicular (Yin et al., 2009), limitando a aquisição de água nos períodos secos e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade agrícola. Os sintomas de deficiência de B podem ser classificados em: primários – consistem em mudanças na composição química e estrutural da parede celular, alterações no metabolismo de fenóis (acumulação de fenóis), inibição da síntese de lignina pelo estímulo da atividade da oxidase de AIA (ácido indolacético), diminuição da concentração de AIA difusível e em mudanças fisiológicas e morfológicas na interface entre a parede celular e a membrana plasmática; secundários – caracterizados pelo acúmulo de fenóis e produção de radicais livres, peroxidação da membrana plasmática, indução da deficiência de Ca e mudanças na distribuição de carboidratos e, em consequência desses efeitos, ocorrem alterações no metabolismo de fitormônios, RNA e DNA (Brown & Hu, 1996).

A seca de ponteiros causada por deficiência de B é problema frequente em florestas de eucalipto (Sgarbi et al., 1999) e ocorre, principalmente, em períodos de baixa disponibilidade hídrica. Os sintomas têm sido corrigidos ou minimizados pela aplicação desse nutriente, via solo ou via pulverização da copa das árvores (Barros, N.F; comunicação pessoal). A ocorrência simultânea destes dois estresses, a deficiência de B e déficit hídrico, parece potencializar os seus efeitos. Plantas de Norway spruce (*Picea abies*) com suprimento adequado de B, quando expostas à seca, apresentaram a mesma

taxa de crescimento das plantas irrigadas, enquanto plantas deficientes em B apresentaram taxa de crescimento significativamente reduzida (Möttönen et al., 2001). Por outro lado, o restabelecimento de níveis hídricos adequados pode favorecer a absorção de B, aliviando sintomas de sua deficiência.

Outras alterações metabólicas em plantas deficientes em B podem conduzir à menor tolerância ao estresse hídrico. Há evidências de que a deficiência em B induz a despolarização da membrana plasmática por causa da menor atividade das H^+ -ATPases e, conseqüentemente, da menor absorção de nutrientes como K (Roberts, 1998). Este nutriente é importante no processo de fechamento estomático e no ajustamento osmótico (Roberts, 1998). Além disso, Möttönen et al. (2005) observaram menor produção de matéria seca do sistema radicular por plantas lenhosas cultivadas na ausência de B, e que plantas bem supridas apresentaram raízes mais compridas e alocaram, proporcionalmente, mais massa nas raízes. Esses autores observaram, também, que os sintomas mais severos de deficiência de B, como amarelecimento das folhas e a morte do meristema apical, foram encontrados em plantas submetidas à maior restrição hídrica. Adicionalmente, em condição de deficiência de B há menor quantidade de canais de absorção de água (aquaporinas) na membrana plasmática, que, por sua vez, são reversivelmente desativadas por altos níveis de radicais hidroxil (*OH) (Henzler et al., 2004), cujo acúmulo é induzido pelo baixo suprimento de B e pelo estresse hídrico. Desta forma, supõe-se que a atividade das aquaporinas pode ser indiretamente reduzida pelo baixo suprimento de B, e espera-se que plantas bem nutridas neste nutriente apresentem maior capacidade de absorção de água e melhor controle estomático, o que poderia lhes conferir maior tolerância a períodos de seca prolongados. Espera-se, também, que maior grau de tolerância às condições de baixa disponibilidade de água esteja relacionado com um sistema radicular maior e com maior eficiência transpiracional, e que estes, por sua vez, possam ser mais eficientes em condições de boa disponibilidade de B.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência da fertilização com B em clones de eucalipto, cultivados sem ou com restrição hídrica, na tolerância ao déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois clones, um mais sensível e outro mais tolerante ao estresse hídrico, foram selecionados para se verificar a influência da disponibilidade de B e da restrição hídrica, na tolerância desses materiais ao déficit hídrico. Mudanças produzidas por micro estaquia foram aclimatadas em solução nutritiva de Clark (Clark 1975) com pH 5,5 e baixa disponibilidade de B ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), em 16 bandejas com 10 L de solução. Quatro plantas de cada clone foram cultivadas em cada bandeja. Após período de aclimação de 28 dias em condições de casa de vegetação, metade das plantas foi transferida para solução de Clark com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B e a outra metade para a mesma solução sem B. Nesse momento, em metade das bandejas, iniciou-se a redução do potencial hídrico da solução nutritiva, realizada pela adição da dose de PEG 6000 necessária para reduzir o potencial hídrico da solução à $-1,5 \text{ MPa}$. A dose de PEG foi dividida em cinco porções que foram aplicadas num período de dez dias. A outra metade das bandejas teve potencial hídrico da solução nutritiva mantido próximo a $-0,05 \text{ MPa}$. Assim, os tratamentos constituíram um fatorial $2 \times 2 \times 2$ com quatro repetições, com dois materiais genéticos, um sensível e outro tolerante ao estresse hídrico, duas concentrações de B, sem e com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, e dois potenciais hídricos da solução nutritiva, $-0,05$ e $-1,5 \text{ MPa}$.

As plantas foram cultivadas por mais dez dias, após terminada a adição de PEG, até que sintomas visuais de estresse hídrico foram observados, sendo caracterizado por murcha parcial das plantas ao entardecer. Na madrugada do dia seguinte, com as plantas túrgidas, foi determinado o potencial hídrico foliar, com bomba de pressão tipo Scholander. Na manhã desse dia, as trocas gasosas foram analisadas em folhas completamente expandidas, do terceiro ou do quarto par à partir do ápice de ramos medianos das plantas. As taxas de assimilação líquida de carbono, a condutância estomática e a transpiração foram medidas em sistema aberto, entre 08:00 e 10:00 h, sob luz saturante artificial ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), com um analisador de gás a infravermelho portátil (LCA4, Analytical Development Company-ADC, Kings Lynn, Reino Unido). Em seguida, foram colhidas amostras de folhas novas, folhas velhas, galhos e raízes. Essas amostras foram secadas em estufa com circulação forçada de ar por 72 h a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ para determinação da matéria seca; em seguida foram moídas para determinação dos

teores de B, após digestão em mufla a 550 °C, pelo método espectroscópico da azometina H⁺ a 410 nm (Wolf, 1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A disponibilidade de água foi o fator que mais influenciou a produção de matéria seca dos dois clones avaliados (Quadro 1). A redução do potencial da solução nutritiva de -0,05 para -1,5 MPa causou menor produção de matéria seca da parte aérea e das raízes, que foi, em média, 1,66 e 1,85 vezes menor, respectivamente. O primeiro reflexo da diminuição da disponibilidade de água é o fechamento dos estômatos. Dependendo das condições, o fechamento dos estômatos pode levar a concentrações baixas de CO₂ no sítio de carboxilação e, conseqüentemente, reduzir sua assimilação. No clone sensível a adição de B propiciou, em média, aumento na produção de matéria seca pela parte aérea de 23,9 %, para as plantas cultivadas sob déficit hídrico, enquanto no clone tolerante houve aumento de 49,6 % (Quadro 1). O aumento mais expressivo na produção de matéria seca pelo clone tolerante, em razão da adição de B, sugere que esse nutriente contribui para maior tolerância à seca. Como isso não ocorreu no clone sensível, é possível que o B possa ativar mecanismos relacionados à tolerância ao déficit hídrico no clone tolerante, que não estariam presentes no clone sensível. Corroborando com isso, genes relacionados à adaptação a condições de baixa disponibilidade de água, apresentaram maior expressão nos tecidos radiculares do clone tolerante (Capítulo III).

Observações de campo mostraram que florestas de eucalipto fertilizadas com B, por meio de adubação foliar, no fim da estação chuvosa, apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento normal no período seco que aquelas que não foram adubadas (Barros, N.F.; comunicação pessoal) . Os efeitos benéficos do B podem ser: **diretos** – plantas bem supridas com esse elemento apresentam padrão diferencial da partição de fotoassimilados, no sentido de promover maior relação raiz/parte aérea de plantas cultivadas sob restrição hídrica (Cakmak et al., 1995; Möttönen et al., 2005). Possivelmente, isso se deve à importância desse micronutriente na formação de ligações boro-diéster, responsáveis pela ligação cruzada de compostos pécticos formadores da parede celular (O'Neill et al., 1996; O'Neill et al., 2004). Essas ligações cruzadas dos compostos pécticos são essenciais para crescimento das plantas (O'Neill et al., 2001).

Quadro 1. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e de raízes (MSR), relação raiz/parte aérea, teor de B nas folhas novas (FN), folhas velhas (FV), caule e raiz e potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) dos clones sensível e tolerante ao déficit hídrico, de acordo com o potencial hídrico (Ψ_{ws}) e da dose de B na solução nutritiva

Ψ_{ws}	Dose	MSPA	MSR	R/PA	Ψ_{wf}	Teor de Boro			
						FN	FV	Caule	Raízes
MPa	μM	-----g-----			MPa	-----mg kg ⁻¹ -----			
Clone Sensível									
0	15	25,6Aa	7,4Aa	0,28Ba	-0,52Ab	61,4Aa	56,0Aa	41,9Aa	52,7Aa
0	0	13,9Ba	7,4Aa	0,69Aa	-0,52Ab	38,2Bb	29,7Bb	34,9Ba	42,0Ba
-1,5	15	13,5Ab	4,6Ab	0,33Aa	-1,50Aa	54,7Ab	42,2Ab	33,9Ab	47,4Aa
-1,5	0	10,9Aa	4,1Ab	0,38Ab	-1,40Aa	49,7Aa	41,0Aa	35,8Aa	46,9Aa
Clone Tolerante									
0	15	23,2Ba	7,8Ba	0,35Aa	-0,46Ab	56,0Aa	38,4Ab	38,7Aa	57,9Aa
0	0	33,1Aa	11,3Aa	0,34Aa	-0,41Ab	44,9Ba	32,6Aa	36,7Aa	49,6Ba
-1,5	15	19,9Aa	5,4Aa	0,27Ab	-1,44Aa	50,0Ab	56,1Aa	36,7Aa	44,9Ab
-1,5	0	13,3Bb	4,2Ab	0,33Aa	-1,51Aa	39,2Ba	38,2Ba	36,3Aa	43,9Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para cada potencial hídrico da solução nutritiva (efeito da dose de B), e pela mesma letra minúscula, para cada dose de B (efeito do potencial hídrico da solução nutritiva), não diferem entre si pelo teste F a 5 %.

Trabalho de nosso grupo indicou maior expressão de genes relacionados à síntese de parede celular nas raízes de plantas tolerantes cultivadas sob restrições hídricas na presença de B (Nunes, F.N., dados não publicados). Esses autores sugeriram que isso propiciaria maior crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, maior absorção de água. **Indiretamente**, o B está relacionado a um sistema anti-oxidativo mais eficiente. Um dos efeitos do déficit hídrico é a produção de moléculas de oxigênio reativas, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido (O_2^*). Essas espécies de oxigênio reativo podem causar a peroxidação de macromoléculas como proteínas e lipídeos (Yamamoto et al., 2001), podendo acarretar perda da integridade da membrana plasmática e, também, desestruturação de proteínas e enzimas, levando a perda da atividade biológica. Segundo Ruiz et al. (2006), plantas bem supridas com B apresentam maior síntese de glutathiona, que está associada à detoxificação de espécies

de oxigênio reativas decorrentes da toxidez de Al. O acúmulo de espécies de oxigênio reativas em células cultivadas na ausência de B, juntamente com menor teor de ascorbato, composto eficaz no combate a essas espécies de oxigênio, também foi contatado por Koshiba, et al. (2009). Desta forma, o maior incremento na produção de matéria seca pelo clone tolerante, na presença de B, parece ser, pelo menos em parte, devido a existência de mecanismos relacionados à tolerância ao déficit hídrico.

Apesar da adição de B ter favorecido maior produção de matéria seca da parte aérea, ela não contribuiu para aumentar a produção de matéria seca das raízes, independentemente da disponibilidade de água, fato que não era esperado (Quadro 1). Assim, uma maior relação raiz/parte aérea, que sinaliza para maior capacidade de aquisição de água, não foi verificada neste trabalho (Quadro 1). Possivelmente, isso foi em decorrência do curto período de tempo, 20 dias, no qual as plantas foram submetidas à omissão de B. Isso sugere que diferenças na partição de fotoassimilados dependem de maior período de tempo para se manifestar.

Neste trabalho, os valores de potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}), determinados entre 4:00 e 5:00 h da manhã, foram, em média, de -0,48 e -1,46 MPa, para os tratamentos sem e com limitação hídrica (Quadro 1). Estes valores são menores que os encontrados por Mattiello et al. (2009b), que indicaram que há elevação dos valores de Ψ_{wf} após período noturno, em decorrência do restabelecimento da hidratação dos tecidos. A redução do potencial hídrico da solução nutritiva de 0 para -1,5 MPa acarretou redução do potencial hídrico foliar, causando menor produção de matéria seca de parte aérea e da raiz (Quadro 1). Os valores de potencial hídrico foliar não foram influenciados pela adição de B à solução nutritiva, porém a adição desse micronutriente favoreceu a produção de matéria seca da parte aérea, principalmente no clone tolerante, como já discutido. Entretanto, a produção de matéria seca das plantas com B e com restrição hídrica foi significativamente menor que aquela correspondente ao tratamento com B e sem restrição hídrica. Möttönen et al. (2005), trabalhando com espécie lenhosa de clima temperado, mostraram que a fertilização com B elevou a produção de matéria seca de plantas cultivadas sob déficit hídrico aos mesmos patamares daquela observada para as plantas cultivadas sem restrições hídrica ou nutricional. Como já discutido, o B pode contribuir para ativação de mecanismo(s) de tolerância ao déficit hídrico ou, ainda, que em condições de sua deficiência há agravamento dos efeitos da restrição hídrica.

Neste trabalho, observou-se que as plantas cultivadas com limitada disponibilidade de água apresentaram, inicialmente, aspecto de murcha ao entardecer

que evoluiu para clorose internerval das folhas velhas; esses sintomas foram agravados pela deficiência de B (Figura 1). Por outro lado, os sintomas de deficiência de B foram mais visíveis nos meristemas caulinares, caracterizados pela brotação de ramos laterais no ápice caulinar (Figura 1). Outro sintoma de deficiência de B observado neste trabalho foi o enrugamento do limbo foliar que, também, apresentou aspecto coriáceo, conforme constatado por Mattiello et al. (2009a).

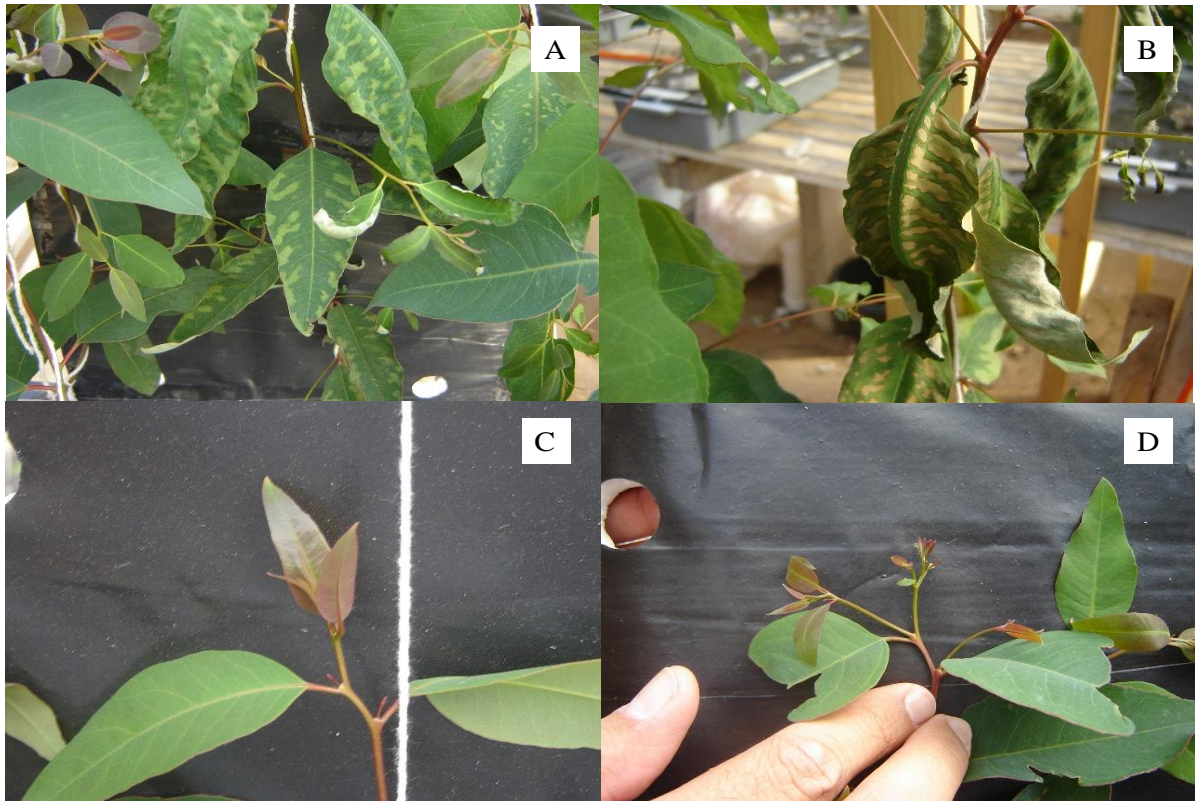


Figura 1. Sintomas visuais de déficit hídrico no clone sensível cultivado na ausência de B e sob limitações hídricas (A e B), planta sem (C) e com (D) sintoma de deficiência de boro.

A adição de B à solução nutritiva contribuiu para maior concentração deste nutriente, principalmente, nas folhas (Quadro 1). Foi observado maior taxa fotossintética (A) nos tratamentos que receberam B, à semelhança do que ocorreu com a produção de matéria seca pela parte aérea (Figura 2). A maior A para os tratamentos que receberam B, independentemente do clone e da disponibilidade de água, coincidiu com maior valor de condutância estomática (g_s) (Figura 2). Limitação estomática é tida como principal limitante a A , por causar redução da concentração interna de CO_2 (Lawson et al., 2003), como observado neste estudo (Figura 2). Em condições de deficiência de B há acúmulo de açúcares e amido nos tecidos foliares (Han et al., 2008), favorecendo a inibição da atividade fotossintética pela inibição do ciclo de Calvin. A redução da A propicia menor dreno de elétrons favorecendo hiper excitação da cadeia transportadora de elétrons, principalmente, em condições de alta luminosidade. Esse excesso de energia, não drenado pela assimilação de C, resulta na produção de H_2O_2 (Chen & Cheng, 2003).

A adição de B à solução nutritiva propiciou maiores valores de g_s (Figura 2) e transpiração (E), indicando que condições que propiciam maior produção de matéria seca também favorecem para maior fluxo transpiracional. Comportamento contrário, menor condutância estomática e menor fluxo transpiracional, causaria redução da concentração interna de CO_2 (C_i) e contribuiria para maior fotorespiração e, conseqüentemente, maior produção de H_2O_2 (Noctor et al., 2002). A adição de B à solução nutritiva, considerando apenas os tratamentos sem limitação hídrica, não causou diferenças significativas entre os valores de C_i em ambos os clones. Por outro lado, nos tratamentos com limitação hídrica, a adição de B propiciou maior C_i (Figura 2). Desta forma, a adição de B ajuda a manter a C_i , nas plantas sob estresse hídrico, nos mesmos patamares daqueles encontrados nas plantas sem estresse. Assim, o B contribui para maior produção de matéria seca, maior A , por favorecer suprimento adequado de CO_2 à 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase. Segundo Reddy et al. (2004), uma das limitações do déficit hídrico à produção vegetal é a redução da g_s e C_i .

Diante do observado neste trabalho, espera-se que o B apresente importante papel na produção de biomassa de plantas de eucalipto cultivadas em condições com baixa disponibilidade de água. É possível que esse nutriente favoreça, em plantas sob déficit hídrico, mecanismos que propiciam maior absorção de água, visto a maior g_s , E e C_i observadas na plantas cultivadas na presença de B e sob déficit hídrico. A maior

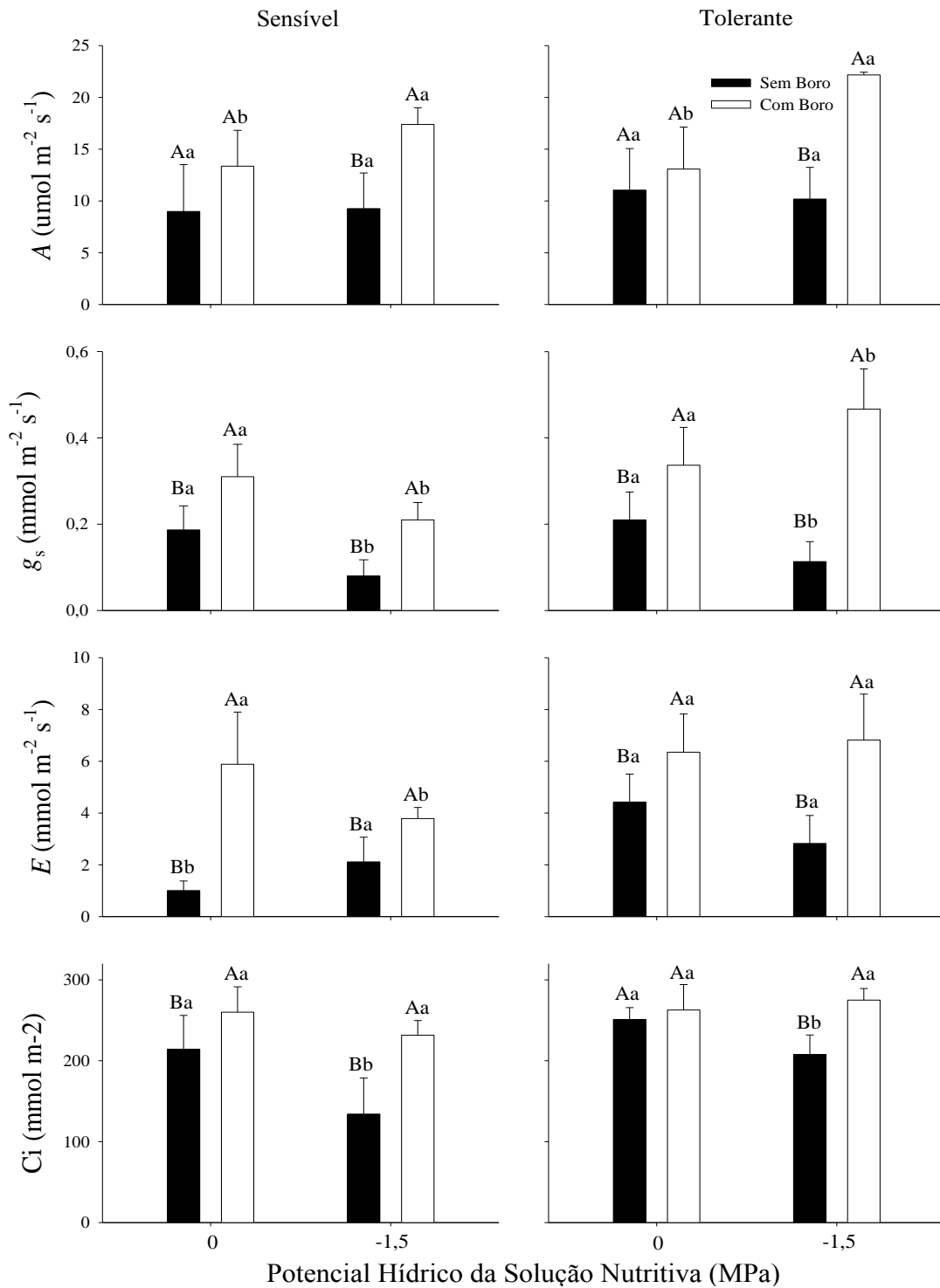


Figura 2. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração interna de CO_2 (C_i), no clone sensível e no tolerante ao déficit hídrico, em função da disponibilidade de B e do potencial hídrico da solução nutritiva. Cada barra representa média de quatro repetições com respectivo erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para cada potencial hídrico da solução (efeito da dose de B), e pela mesma letra minúscula, para cada dose de B (efeito do potencial hídrico da solução), não diferem entre si pelo teste F a 5 %.

absorção de água pode se decorrente do maior crescimento do sistema radicular - apesar de não ter sido observado neste trabalho -, da maior atividade de aquaporinas, ajustamento osmótico. A produção de matéria seca de raízes não foi influenciada pela disponibilidade de B, possivelmente pelo curto período de tempo que as plantas foram submetidas à omissão desse micronutriente. Assim especula-se que as maiores taxas dos parâmetros fisiológicos foram decorrentes da maior atividade de aquaporinas, tendo em vista a estreita relação dessas com o metabolismo de compostos fenólicos, assim como o B; ou do ajustamento osmótico, tendo em vista a influencia do B na atividade de H⁺-ATPases e, conseqüentemente, na polarização da membrana plasmática.

CONCLUSÕES

- O déficit hídrico promoveu redução na produção de matéria seca da parte aérea e de raízes dos clones de eucalipto, tolerante e sensível a esse déficit. A adição de B à solução nutritiva propiciou incremento na produção de matéria seca da parte aérea e dos teores de B nos tecidos dos dois clones, independente da disponibilidade hídrica.
- A adição de B sob condições hídricas limitantes aumenta a produção de matéria seca, principalmente no clone tolerante ao déficit hídrico.
- A adição de B propiciou maior taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração nos dois clones

Capítulo 3 - Expressão Gênica em Clones de Eucalipto Influenciada pelo Suprimento de Boro, Déficit Hídrico.

Resumo: A tolerância à seca é uma característica codificada por vários genes que dificulta a seleção de plantas tolerantes em programas de melhoramento genético. Nas plantas ela controlada por mecanismos que atuam em conjunto ou isoladamente para tolerar períodos de déficit hídrico. Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico apresentam diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica quando submetidos a períodos de seca. Neste trabalho objetivou-se identificar genes diferencialmente expressos em dois clones de eucalipto em função da disponibilidade de B e água. Dois clones de eucalipto, um sensível e outro tolerante ao estresse hídrico, foram cultivados em solução nutritiva sem ou com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B, nos potenciais de aproximadamente 0 ou -1,5 MPa. Após 10 dias, amostras de folhas e raízes, de aproximadamente 1 g, foram colhidas para extração de RNA. Foram selecionados quatro genes relacionados ao transporte de B e polióis, e outros quatro relacionados à síntese de parede celular, sendo estes detectados por meio RT-PCR. Os genes relacionados ao transporte de B e polióis e os genes relacionados a síntese de parede celular apresentaram maior expressão relativa nos tecidos radiculares do clone tolerante quando esse foi cultivado sob déficit hídrico, na presença de B. A maior expressão dos genes *PtrPLT* e *MaT2*, transportadores de polióis, pode estar relacionada com a importância desses na síntese de parede celular, por propiciar adequado suprimento de carbono orgânico como fonte de energia e, ou, esqueleto carbônico. Os genes *BOR1* e *BOR2*, transportadores de B relacionados ao efluxo desse elemento para o floema, também mostraram maior expressão relativa no clone tolerante, sugerindo maior acúmulo de B na parte aérea nesse clone. Sugere-se que os genes das duas classes estão envolvidos na síntese de parede celular nas plantas; primeiro, a maior expressão de transportadores de polióis contribui com o suprimento de carbono; segundo, os transportadores de B vão propiciar adequado suprimento desse nutriente, que está relacionado com dimerização de compostos pécticos constituintes da parede celular e, terceiro, efeito direto da maior expressão dos genes relacionados a síntese de parede celular. Assim, os genes de uma classe podem colaborar sinergicamente com genes envolvidos em outras atividades metabólicas. Salienta-se que os genes apresentaram maior expressão relativa na raiz, sinalizando maior crescimento do sistema radicular,

estratégias para maior aquisição de nutrientes e água, contornando os problemas causados por longos períodos de estiagem.

Chapter 3 – Gene expression in eucalypt clones influenced by boron supply and water stress

Abstract: Drought tolerance is a plant trait controlled by several genes, what makes the breeding programs more difficult. This plant characteristic is thought to be controlled by mechanisms working in tandem or even isolated to achieve drought tolerance. Genotypes showing different drought tolerance have differences in their gene expression patterns when submitted to drought period. This work aimed identifying genes with different expression rates in two eucalypt clones influenced by B and water availability. Seedlings of two *Eucalyptus urophylla* clones, one sensible (3334) and the other tolerant (3335) to water stress, were cultivated in a nutrient solution with two B rates (0 and 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and two water potential (0,05 and 15 Mpa). Ten days after beginning treatment applications, 1 g of leaf and root samples, were collected for RNA extraction. Four genes related to the B and polyol transport, and four genes related to cell wall synthesis were selected, and analyzed by RT-PCR. The genes related to B and polyol transport and the genes related to cell wall synthesis showed higher relative expression in root tissues in the tolerant clone when cultivated under water stress and B supply. Higher of polyol transporters expression (PtrPLT and MaT2 gene) could be related to genes importance on cell wall synthesis, as these genes could favor an adequate supply of organic carbon as energy source and carbon backbone. The BOR1 and BOR2 genes encode for B efflux and are the transporter responsible for the xylem loading. These genes showed higher relative expression in the tolerant clone indicating a higher B accumulation in the shoot as compared with the sensible. It is suggested that the genes for both functions are related to cell wall synthesis; first, higher expression level of the polyol transporters could contribute to carbon supply to the root system; second, the B transporters could favor an adequate supply of this micronutrient, which form a cross-link with pectin compounds in the plant cell walls; third, a direct effect of the genes related to the cell wall synthesis. Thus the genes involved in a one function could have influence on those genes performing another metabolic function. Furthermore, these genes have shown high expression levels in the roots, signaling for a higher root system development, strategy for an improved water and nutrient acquisition, overcoming problems related to long drought periods.

INTRODUÇÃO

Estresses abióticos estão entre as principais causas da baixa produtividade agrícola reduzindo em mais de 50 % a produtividade das plantas cultivadas. Dentre esses, destaca-se o déficit hídrico. No Brasil, o déficit hídrico é o principal fator limitante da produtividade do eucalipto, mesmo das espécies consideradas tolerantes a este déficit. Atualmente, as florestas plantadas vêm expandindo para áreas consideradas marginais, caracterizadas pela baixa disponibilidade de água e nutrientes, como as regiões norte e noroeste de Minas Gerais. Essas áreas apresentam severos problemas com a seca e solos com baixa fertilidade natural, o que tem causado o aparecimento de deficiências nutricionais, notadamente de B. Sintomas de deficiência deste nutriente são mais frequentes em áreas com baixa disponibilidade hídrica (Shorrocks, 1997), por reduzir o seu transporte às raízes.

A seca de ponteiros em plantas de eucalipto, um dos sintomas típicos da deficiência de B, é decorrente de deformações dos meristemas apicais causadas pela má formação da parede celular (Bolaños et al., 2004). Além da seca de ponteiros, a deficiência de B pode influenciar processos fisiológicos como, por exemplo, transporte de açúcares, lignificação, síntese e estruturação da parede celular, metabolismo de carboidratos, RNA, ácido indolacético, fenóis, ascorbato e integridade da membrana plasmática (Cakmak & Römheld, 1997). Os primeiros sintomas de carência deste micronutriente na planta manifestam-se em nível de organização de parede celular primária e lamela média (Ishii et al., 2001; Silva et al., 2008) e, em decorrência disso, há seca de ponteiros. Até 90 % do B absorvido pelas plantas encontra-se localizado na parede celular (Loomis & Durst, 1992) e grande parte do B na parede celular encontra-se na forma de complexos cis-diol de borato-éster, responsáveis pela dimerização de compostos pécticos ramnogalacturonanos I e II (RGI e RGII) (O'Neill et al., 1996; Ishii et al., 2001). A habilidade de formar ligações boro-diésteres com grupamentos hidroxil dos carboidratos e, ou, glicoproteínas favorece a ligação cruzada entre os polissacarídeos de parede celular (Loomis & Durst, 1992). Como o B faz parte do componente péctico RGII e a rede péctica representa o principal componente estrutural de manutenção no ápice do tubo polínico, esse elemento torna-se principal o micronutriente na maioria dos meios de cultura para germinação de polén (Delmas et

al., 2008). Além disso, está associado ao controle de fluidez de membrana e manutenção da conformação de canais e transportadores de ions, e enzimas por realizar ligação a glicolipídeos e glicoproteínas.

Os polióis, também chamados de álcool-açúcares, podem apresentar molécula linear (poliol acíclico ou alditol) ou cíclica (polióis cíclicos ou ciclitóis), são formas comuns de açúcares em muitas plantas e outros organismos (Noiraud et al., 2001). Os polióis são solutos ativos osmoticamente, notadamente em resposta a estresses abióticos, de forma a compensar redução no potencial hídrico aumentando, assim, a tolerância a déficit hídrico (Pommerrenig et al., 2007). Também, podem proteger a célula e enzimas contra o estresse oxidativo (Yancey, 2001), e aumentar mobilidade do B na planta (Bellaloui et al., 1999; Lehto et al. 2004; Tanaka & Fujiwara, 2008). Seu transporte a longa distância através do floema tem sido demonstrado em plantas e, em algumas espécies, pode ser o principal açúcar transportado neste tecido vascular (Noiraud et al., 2001). Alguns transportadores de polióis têm sido identificados e caracterizados em *Arabidopsis thaliana*, como AgMaT2 (Juchaux-Cachau et al., 2007) e AtPLT5 (Klepek et al., 2005). Entretanto, evidências da função destes dois transportadores ainda são circunstanciais, de forma que o seu papel fisiológico não está ainda demonstrado.

Recentemente se tem identificado genes relacionados na eficiência do uso do B. Inicialmente, em 2002, foi isolado um mutante com menor teor de B, cujo gene, recém clonado, corresponde a um transportador de efluxo, denominado AtBOR1, responsável pelo carregamento do xilema, protegendo os meristemas apicais contra a deficiência de B (Takano et al., 2002; Takano et al., 2006). Outra proteína componente da membrana, denominada NIP5:1, foi identificada como canal de absorção de B. Esta tem papel crucial no crescimento e desenvolvimento de *Arabidopsis* sob condições limitantes de B (Takano et al., 2006). Usando a subtração diferencial de cDNAs, Kobayashi et al. (2004) identificaram 13 genes induzidos por baixo suprimento de B em tabaco, muitos deles associados com mecanismo antioxidativo. Assim, esses autores propuseram que a deficiência de B pode causar desbalanço no potencial redox celular.

A tolerância a déficit hídrico é uma característica controlada por vários genes dificultando programas de melhoramento genético. Adicionalmente, a seleção de novos clones visa, principalmente, ao aumento da produtividade sem muita preocupação com a seleção de plantas tolerantes a déficit hídrico. Trabalhos de melhoramento também têm sido limitados pela complexidade das características que conferem a tolerância a déficit

hídrico, baixa variância genética dos componentes que definem o rendimento sobre condições de estresse e a falta de técnicas eficientes de seleção (Blum 1998; Blum et al. 1999).

A técnica de RT-PCR, PCR em tempo real, é altamente sensível, permitindo a detecção de genes com baixa expressão apresentando, também, capacidade para detectar a maioria dos fatores transcricionais (Holland, 2002). Em razão de se desconhecer o nível de expressão dos genes relacionados à disponibilidade hídrica e de B, esta técnica foi adotada por possibilitar a análise de genes pouco expressos e a identificação dos padrões de expressão desses genes. Isso possibilita o conhecimento dos mecanismos relacionados à adaptação de plantas de eucalipto ao déficit hídrico e pode contribuir para a seleção de clones mais apropriados e eficientes em condições ambientais de baixa disponibilidade de água e B, como em muitas áreas onde essa cultura vem sendo conduzida. Neste trabalho objetivou-se avaliar a transcrição diferencial de genes entre dois clones de eucalipto, um tolerante e outro sensível a déficit hídrico, em razão da disponibilidade hídrica e de B.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético e desenho experimental

Dois clones de *Eucalyptus urophylla*, um sensível e outro tolerante ao estresse hídrico, foram selecionados para se avaliar o efeito da disponibilidade de B e da restrição hídrica sobre a tolerância a déficit hídrico. Mudanças produzidas por microestaquia foram inicialmente crescidas em solução nutritiva de Clark ½ força (Clark 1975), pH 5,5, e baixa disponibilidade de B ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), em 12 bandejas com 10 L de capacidade, com quatro plantas de cada clone por bandeja. Após um período de aclimação de 15 dias em condições de casa de vegetação, metade das plantas foi transferida para solução de Clark com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de B e a outra metade para a mesma solução sem B. Nesse momento, em metade das bandejas, iniciou-se a redução do potencial hídrico da solução nutritiva pela adição gradual de PEG 6000, de forma que ao final de sete dias obteve-se potencial hídrico de -1,5 MPa. A outra metade das bandejas (plantas) teve potencial hídrico mantido próximo de 0 MPa (-0,05 MPa). Assim, os tratamentos constituíram um fatorial $2 \times 2 \times 2$ com quatro repetições, com dois materiais genéticos, um sensível e outro tolerante ao estresse hídrico, duas concentrações de B, sem e com $15 \mu\text{mol L}^{-1}$, e dois potenciais hídricos da solução nutritiva, 0 e -1,5 MPa. Após a aplicação desses tratamentos, as plantas foram cultivadas até que sintomas visuais de estresse hídrico fossem observados, como por exemplo: murcha parcial das plantas ao entardecer. Constatada essa situação, amostras de folhas novas e raízes de cada planta foram coletadas e imediatamente congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA.

Para a RT-qPCR foram utilizadas duas amostras - compostas pela união de três plantas - de cada tratamento, sendo cada amostra analisada em quadruplicatas.

Extração de RNA total

Um grama de cada amostra foi macerado em nitrogênio líquido e coletado em dois tubos de microcentrifuga de 2,0 mL de capacidade. Em seguida, foi adicionado 1,2 mL de tampão de extração, composto por 2 mol L^{-1} de NaCl, 25 mmol L^{-1} de EDTA,

200 mmol L⁻¹ de Tris (pH 8,0), 20 mmol L⁻¹ de borato de sódio, 2 % de PVPP (p/v), 2 % de CTAB (p/v), 1 % de LSS (p/v), e 2 % de b-mercaptoethanol (v/v). A amostra foi homogeneizada com o tampão com auxílio de vortex e incubada a 65 °C em banho de água por 10 min. Depois da incubação o material foi centrifugado à 15,000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo contendo 10 mL de fenol saturado/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v/v, pH 4.5). Em seguida, cada amostra foi agitada em vortex e centrifugada a 12,000 g por 10 min a 4 °C. O passo anterior foi repetido até que o sobrenadante ficasse totalmente limpo, coletando-o em novo tubo que foi centrifugado a 12,000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante, que foi coletado e transferido a um tubo de microcentrífuga, foi homogeneizado com 50 µL de NaAc 3 mol L⁻¹ (pH 5,3) e, finalmente, adicionado um volume de isopropanol a -20 °C. A mistura foi incubada a -20 °C por pelo menos 10 min, seguindo-se centrifugação a 15,000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi imediatamente descartado e o pelet enxaguado com etanol 75 %, e secado à temperatura ambiente. Depois, o pelet foi ressuspenso em 50 µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80 °C até o momento do uso (Wand et al., 2007)

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e sua concentração ajustada para 300 ng µL⁻¹. Sua integridade física foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Wilson e Walker, 2000).

Síntese de cDNA

Com o objetivo de eliminar o DNA contaminante, foi realizado o tratamento com DNase I (2 µg para qRT-PCR), numa reação contendo os seguintes reagentes: 0,5 U de DNase I (RQ1 RNase-Free DNase; *Promega*); tampão de reação 1X, completando com água estéril tratada com DEPC (dietil-pirocarbonato) para o volume final de 10 µL. Depois, se procedeu à incubação a 37 °C por 45 min. A inativação da DNase ocorreu mediante a adição de solução de parada (*RQ1 DNase Stop Solution: Promega*) e incubação a 65 °C por 10 min. Neste ponto, a solução pode ser armazenada a -80 °C ou imediatamente transferida para banho de gelo para realização da etapa a seguir.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Superscrip II (*Invitrogen*) tomando-se com base as instruções do fabricante. Para cada reação foram utilizados 11 µL do produto do tratamento com *DNase I*; 500 ng de oligo-dT₍₁₈₎ e 1 µL de dNTPs (10 mmol

L⁻¹ cada), incubando a 65 °C por 10 min e em gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados 9 µL da mistura composta por: 2 µL de tampão de reação 10X, 2 µL de MgCl₂ 50 mmol L⁻¹, 2 µL de ditioneitol 100 mmol L⁻¹, 1 µL de RNaseOUT inibidor (*Invitrogen*) e 1 µL de água. Depois de uma breve centrifugação, a solução foi incubada a 42 °C por 2 min, e 1,5 µL da enzima *transcriptase reversa II* (200 unidades) foi adicionado, seguido de incubação a 42 °C por 1 h. A inativação da enzima ocorreu a 72 °C por 15 min. Em seguida, foi colocada em gelo. Uma amostra controle (sem a enzima de transcrição reversa) foi adicionada e no final foi avaliada a eficiência da reação por PCR com *primer* constitutivo de Riboproteína 35S de *Eucalyptus.grandis* .

Análise da expressão diferencial dos fragmentos transcritos por RT-qPCR

Foram selecionados oito genes candidatos, buscando-se informações de função e sequências no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e os *primers* foram elaborados, com auxílio do programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), para tamanho aproximado de 19 a 20 bases, T_m (*temperature melting*) entre 54 e 60 °C, produzindo amplicons entre 80 e 140 pares de base. Foram usados como *primers* para genes constitutivos proteína ribossomal (RPtnL23A) e H2B (histona 2B) como genes de referência. Todos os *primers* (Quadro 1) foram utilizados numa concentração final de 0,12 pmol L⁻¹ de cada em reações simplex. As reações de PCR foram compostas por 2,0 µL de tampão (10X *High Fidelity PCR Buffer- Invitrogen*), 1,2 µL de MgCl₂ 50mmol L⁻¹, 0,045 µL de dNTPs (10 mmol L⁻¹ cada), 0,04 µL de ROX (*Invitrogen*) , 0,08 µL de BSA (soro albumina bovino), 2,0 µL de *SYBR Green* 1:10.000 (*Invitrogen*) e 0,05 µL de Taq Platinum 5U µL⁻¹ (*Invitrogen*). O volume final foi completado com água para obter 20 µL em cada reação. A PCR em tempo real foi realizada em equipamento Step-One Plus (*Applied Biosystems*, Foster City, E.U.A.).

A validação de *primers* pela curva padrão relativa foi realizada utilizando-se quatro réplicas de laboratório para cada amostra. O produto da reação de cDNA foi diluído de forma a obter concentração de 1, 5, 25 e 125 vezes menor que a inicial. Foi utilizado 0,28 µL de solução de cDNA em cada reação. O programa de PCR foi ajustado para 90 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, para o estágio de amplificação. Foi realizado, também, um ciclo de 60 °C elevando-se a

Quadro 1. Nome, número de acesso e sequência dos primers utilizados

Nome	N acesso do GenBank	Seq 5'/3'
Genes constitutivos		
RPtnL23A for	db 28432294 - <i>Eucalyptus grandis</i> – proteína ribossomal LA23 (RPtnLA23)	AAGGACCTGAAGAAGGACA
RPtnL23A rev		CCTCAATCTTCTTCATCGCA
H2B For	AY263810 - <i>Eucalyptus globulus</i> – Histona 2B (H2B)	GAGCGTGGAGACGTACAAGA
H2B rev		GGCGAGTTTCTCGAAGATGT
Genes relacionados a transporte de íons e compostos orgânicos		
PtrPLT for	XM_002313773.1 - <i>Populus trichocarpa</i> –transportador de poliól (PtrPLT)	TGGTTGGTCGCTTTGTGCGCC
PtrPLT rev		CCACGGGAAGAGGCTGGAGA
MaT2 for	Gb EU579526.1- <i>Citrus sinensis</i> – transportador de manitol (MaT2)	ACCCCTCCACTTAGGCTGGC
MaT2 rev		CGAGTCGGCCTTGCATCACC
BOR1 for	FJ263935.1 - <i>Vitis vinifera</i> – transportador de boro (BOR1)	ATCGACAAATGCAGACCCCG
BOR1 rev		TCGTCAACCGGGGCATTGAG
BOR2 for	AY070067.1 - <i>Arabidopsis thaliana</i> – canal trocador de anion	CGACCACGCGTCCGAGAATC
BOR2 rev	(ATBOR2/BOR2)	ACGACAGCGAGTCCACCCTC
Genes relacionados a parede celular		
RHM1 for	XM_002331265.1- <i>Populus trichocarpa</i> - dTDP-Dglicose 4,6-dehidratase	AGGCACTGGCTCTCCTCGAA
RMH1 rev		AACTTCCCCAGCAGACCCCC
GTP8 for	AY278316.1 - <i>Populus alba</i> ecotype 6K3 –glicosil transferase 8 A gene	TTCCTGCACTGGAGAAGGTGG
GTP8 rev		TCCATGCAGGTCTCAACTGCTC
GTP47 for	AY935506.1- <i>Populus tremula</i> x <i>Populus</i> <i>tremuloides</i> – família 47 da	GGGCTGGCTCGTAAGTTGCC
GTP47 rev	glicosiltransferase	AGGTCCCCAACTGGTCTCTGC
PME3 for	DQ376133.1 - <i>Eucalyptus globulus</i> subsp. Globules – pectina methylesterase	GAACCGCAAGGACCCGAACC
PME3 rev	(PME3)	GGAAGCTCCCGTTTGAGGCG

temperatura em 0,2 °C a cada 20 s até atingir 95 °C, para determinar os estádios da curva de dissociação. Da mesma forma que os primers alvos, os constitutivos, proteína ribossomal (RPtnL23A) e histona 2B (H2B), foram testados para detectar a homogeneidade de amplificação entre as repetições. Foi determinado o desvio padrão de cada tratamento para os dois primers escolhendo-se aquele que mantivesse maior eficiência de amplificação e menor variação no valor do Ct (*cicle treshold*) médio (Quadro 2).

Foram aceitos conjuntos de *primers* com resultados de coeficiente de determinação acima de 95 %, variância abaixo de 15 % e eficiência de amplificação entre 90 e 100 %. Sloop com valor de aproximadamente -3,0, de acordo com as recomendações do fabricante do instrumento (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA).

Para a análise de dados da qRT-PCR foi usado o software *Step-One Plus* versão 2.0 (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA). Os valores do Ct das réplicas de laboratório foram calculados pelo método de quantificação relativa dos níveis de cópia de amplificação (Ali-Benali et al., 2005). Foi usado como controle o *primer* que apresentou menor variância entre os tratamentos, indicado pela análise do programa *geNorm*, segundo orientações de Vandesompele et al. (2002). Como referência foi utilizada a amostra do genótipo sensível cultivado sem déficit hídrico e suplementado com B. A mudança do nível de amplificação do cDNA do gene alvo foi analisada pela comparação relativa com o gene endógeno, segundo Nicot et al. (2005). A homogeneidade dos dados foi avaliada por meio de análise de variância e teste de homogeneidade de Bartlett ao nível de 5 %. O nível de expressão foi calculado pela fórmula seguinte: $= 2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $-\Delta\Delta Ct = (\Delta C_T \text{ do alvo}) - (\Delta C_T \text{ do gene endógeno})$.

O padrão de co-expressão dos genes, foi avaliado por análise de correlação de *Spearman*. Foi possível detectar a redundância de ativação da transcrição gênica em resposta ao genótipo e ao déficit hídrico e suplementação com B. O grau de dissimilaridade entre os genes foi detectado pelo ordenamento por agrupamento hierárquico por meio de análise de variância multivariada (MANOVA), em clusters, pelo método de ligação divisivo e encadeamento médio em distâncias euclidianas (raiz quadrada da soma dos quadrados das diferenças dos valores para cada variável). Representou-se a média dos grupos em um gráfico de perfis de médias.

As análises estatísticas foram realizadas no programa *STATISTICA* 8.0 (Statsoft®, 2009) e no aplicativo *Microsoft Office Excel* 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação dos genes constitutivos

Da mesma forma que os primers alvos, os constitutivos foram testados para detectar a homogeneidade de amplificação entre as repetições. Os valores de Ct e desvio padrão para os genes constitutivos, proteína ribossomal (RPtnL23A) e histona 2B (H2B), mostraram-se adequados para ambos os genes, porém devido aos menores valores de desvio padrão para o gene RPtnL23A (Quadro 2) indicam maior eficiência de amplificação deste gene.

Os resultados de análise variância sugerem que o par de primers da Ribo, manteve expressão mais estável e com menor variação, em relação aos primers H2B, com valor de estabilidade de 0,1243 e 1986, respectivamente. Desta forma, utilizaram-se os resultados do gene Ribo na análise comparativa de expressão relativa dos genes alvos

Quadro 2. Valores de Ct e desvio padrão dos primers constitutivos da Ribonucleoproteína (Ribo) e da Histona 2B (H2B) dos clones sensível e tolerante ao estresse hídrico influenciados pela disponibilidade de água e de B

Clone	Ψ_w	Boro	Ribonucleoproteína (Ribo)		Histona 2B (H2B)	
			C_T médio	Desvio Padrão	C_T médio	Desvio Padrão
-----Folha-----						
Sensível	0	15	29,86	0,326	31,09	0,989
	0	0	29,67	0,638	30,54	0,850
	-1,5	15	29,33	0,983	31,72	0,845
	-1,5	0	29,29	0,856	31,03	0,991
Tolerante	0	15	29,09	0,729	31,55	1,670
	0	0	29,32	0,930	28,62	4,040
	-1,5	15	29,26	0,832	32,82	2,405
	-1,5	0	29,49	0,554	29,49	0,554
-----Raiz-----						
Sensível	0	15	29,57	0,878	30,74	0,703
	0	0	29,69	0,728	29,84	1,099
	-1,5	15	29,97	0,376	30,43	1,038
	-1,5	0	28,69	0,230	29,04	1,100
Tolerante	0	15	29,58	0,478	29,26	1,033
	0	0	29,36	0,563	30,40	1,045
	-1,5	15	29,29	0,516	28,30	1,014
	-1,5	0	29,06	0,425	29,84	0,744

Análise da expressão dos genes relacionados ao transporte de íons e compostos orgânicos

Dos genes relacionados ao transporte de íons e polióis, o que apresentou maior expressão diferencial foi o transportador de polióis PtrPLT, com expressão relativa de 1,28 e 3,55 no clone tolerante e sensível a déficit hídrico, respectivamente (Figura 1). Esse gene teve sua expressão relativa aumentada no clone tolerante, pela adição de B, nas plantas submetidas ao estresse hídrico, em 2,4 e 8,1 vezes na folha e na raiz, respectivamente, quando comparadas às do clone sensível (Figura 1). De forma semelhante, o gene AtPLT5, da mesma família do PtrPLT, apresentou forte expressão relativa na raiz quando comparada a tecidos foliares, semelhante aos resultados obtidos por Klepek et al. (2005). Esses autores verificaram que esse transportador é localizado na membrana plasmática e que está relacionado ao transporte de polióis alifáticos, cíclicos e de hexoses e pentoses. Esses transportadores são responsáveis pelo carregamento floemático de sorbitol e manitol (Noiraud et al., 2001) ou pela transferência desses compostos do floema para outros tecidos (Juchaux-Cachau et al., 2007). Segundo Klepek et al. (2010) esses transportadores podem estar envolvidos na síntese de parede celular por propiciar adequado suprimento de C orgânico como fonte de energia e, ou, esqueleto carbônico.

A mobilidade floemática do B varia entre espécies sendo considerado imóvel em algumas plantas, como tomateiro (Oertli, 1993) e móvel em outras como macieira e pereira (Brown & Hu, 1996). O possível mecanismo de transporte do B no floema é por meio de complexos B-poliol. Lehto et al. (2004), trabalhando com *Pinus silvestris* e *Picea abies*, mostraram elevada mobilidade floemática de B em ambas espécies e

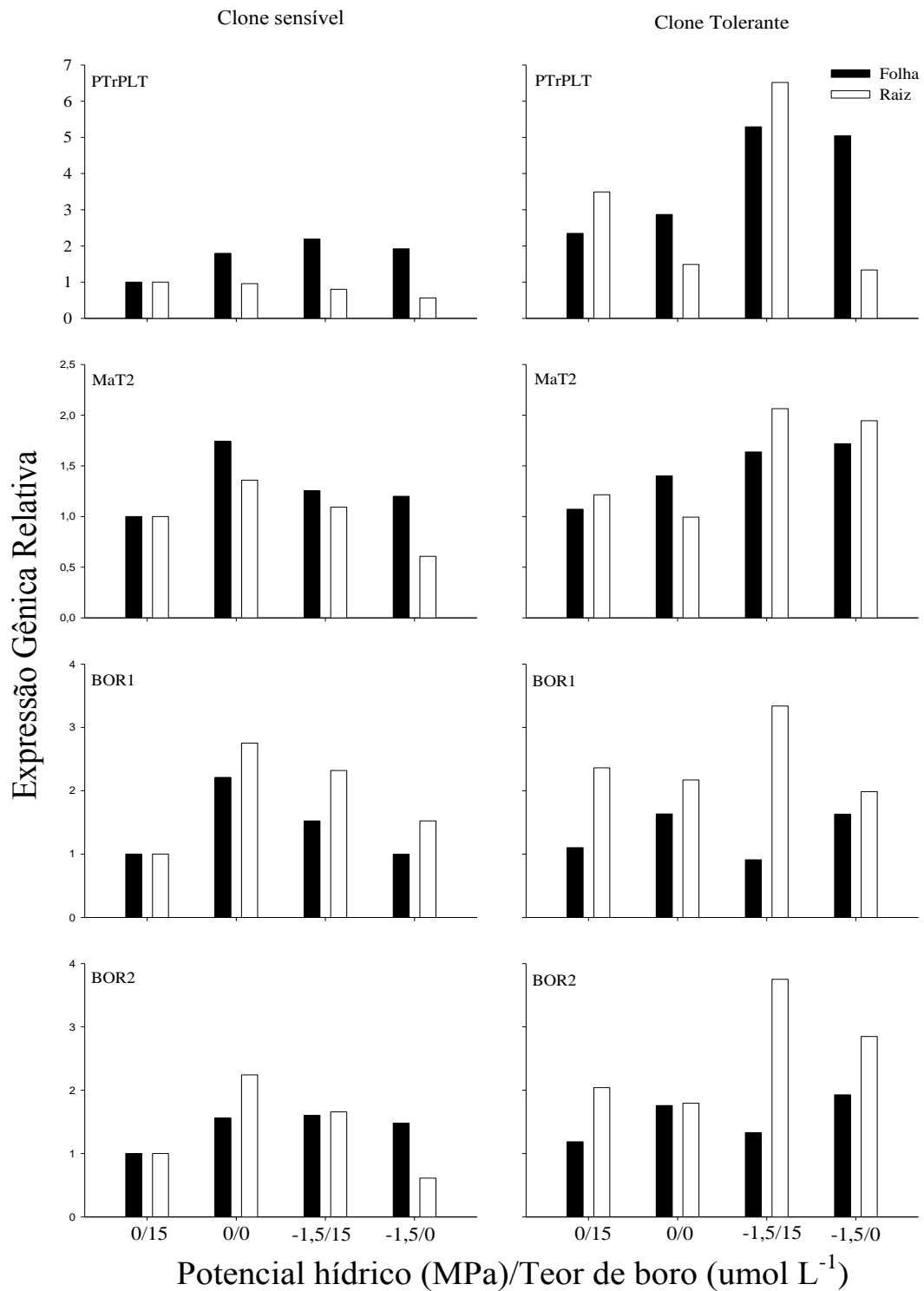


Figura 1. Análise quantitativa da expressão dos genes; transportador de polióis PtrPLT, transportador de manitol (Mat2), transportador de boro (BOR1 e BOR2) nos clones de eucalypto sensível e tolerante ao déficit hídrico e em resposta à disponibilidade de B e ao déficit hídrico.

concluíram que essa mobilidade foi em decorrência da complexação do nutriente com polióis. Assim, os transportadores de polióis podem ter dupla função na síntese de parede celular nas plantas: primeiro, pelo suprimento de C, conforme já discutido e, segundo, pelo suprimento de B, visto o papel desse nutriente na dimerização de compostos pécticos constituintes da parede celular (Ishii et al., 2001).

Outros genes da classe transportadores de íons que tiveram sua expressão aumentada pela adição de B no clone tolerante a déficit hídrico, cultivado sob restrição hídrica, foram os genes BOR1 e BOR2. Esses genes apresentaram maior expressão nos tecidos radiculares em comparação com os foliares (Figura 1), possivelmente em razão de estarem envolvidos no carregamento do xilema. Segundo Nakagawa et al. (2007) BOR1 é um transportador com atividade de efluxo de B, localizado na membrana plasmática e é expresso em tecidos foliares e, principalmente, radiculares. O carregamento do xilema inclui dois transportadores de membrana: 1) relacionado à absorção do nutriente pelas células da epiderme e do córtex e, 2) relacionado ao efluxo do nutriente do periciclo para o xilema. Estudo com mutante de *Arabidopsis* que teve o gene BOR1 deletado de seu genoma mostrou menor teor de B na parte aérea do mutante, em comparação com espécie selvagem (Takano et al., 2002). Esses autores sugeriram que a absorção desse nutriente pelas plantas ocorre principalmente por transporte passivo, pois a concentração de B nas células das raízes do mutante e da planta selvagem era semelhante. Porém, como já comentado, as plantas mutantes apresentaram menor teor de B na parte aérea, indicando a importância do carregamento xilemático no acúmulo deste nutriente. Além disso, plantas transformadas com o gene BOR1 apresentam maior translocação de B das raízes para a parte aérea, quando cultivadas em condições de baixa disponibilidade desse micronutriente (Miwa et al., 2006). Esses autores também verificaram que plantas transgênicas mantinham suprimento adequado de B para a produção de sementes, mesmo em condições limitantes de B, enquanto plantas selvagens, por não suprirem a parte aérea de forma adequada, não produziram sementes viáveis.

Fato contrário à literatura foi a maior expressão do gene BOR1 e BOR2 nas plantas cultivadas na presença de B, sugerindo que o acúmulo desses transportadores é positivamente influenciado pela disponibilidade desse elemento. Outros autores sugerem que haveria maior expressão desses genes em condições de deficiência de B (Nakagawa et al., 2007). Adicionalmente, foi demonstrado que o gene BOR1 é regulado pós-transcricionalmente em resposta à disponibilidade de B (Takano et al., 2005). Esse

mecanismo de regulação é importante, pois previne o acúmulo excessivo desse nutriente na parte aérea, em condições de alta disponibilidade de B.

Análise da expressão dos genes relacionados a síntese de parede celular

Os genes relacionados à síntese de parede celular apresentaram maior expressão gênica relativa no tecido radicular do clone tolerante ao déficit hídrico, quando comparada com o clone sensível, principalmente quando cultivado sob restrição hídrica e na presença de B (Figura 2). O gene RHM1 está relacionado com a conversão de dTDP-glicose a sTDP-rhamnose, componente do composto péctico rhamogalacturano 1 (RGI). A parede celular tem sua matrix construída com microfibrilas de celulose firmemente ligadas com outros polissacarídeos como, hemicelulose e pectinas. As pectinas são as principais constituintes da lamela média das células vegetais e são contituidas por polímeros de ácido galacturônico, homogalacturano e rhamnogalacturanos I e II (O'Neill et al., 1990). Semelhantemente, os genes da família glicosiltransferase também estão relacionados com a síntese de compostos pécticos. A inativação desses genes pode acarretar a perda de aderência entre células, tornando as plantas mais sensíveis à desidratação (Bouton et al., 2002). Já os genes da família pectina metiltransferase são responsáveis pela metilação dos grupamentos carboxil dos compostos pécticos (Ishikawa et al., 2000). Segundo esses autores a pectina metiltransferase catalisa a transferência do grupo metil de S-adenosil-L-metionina para o C 6 do ácido galacturônico.

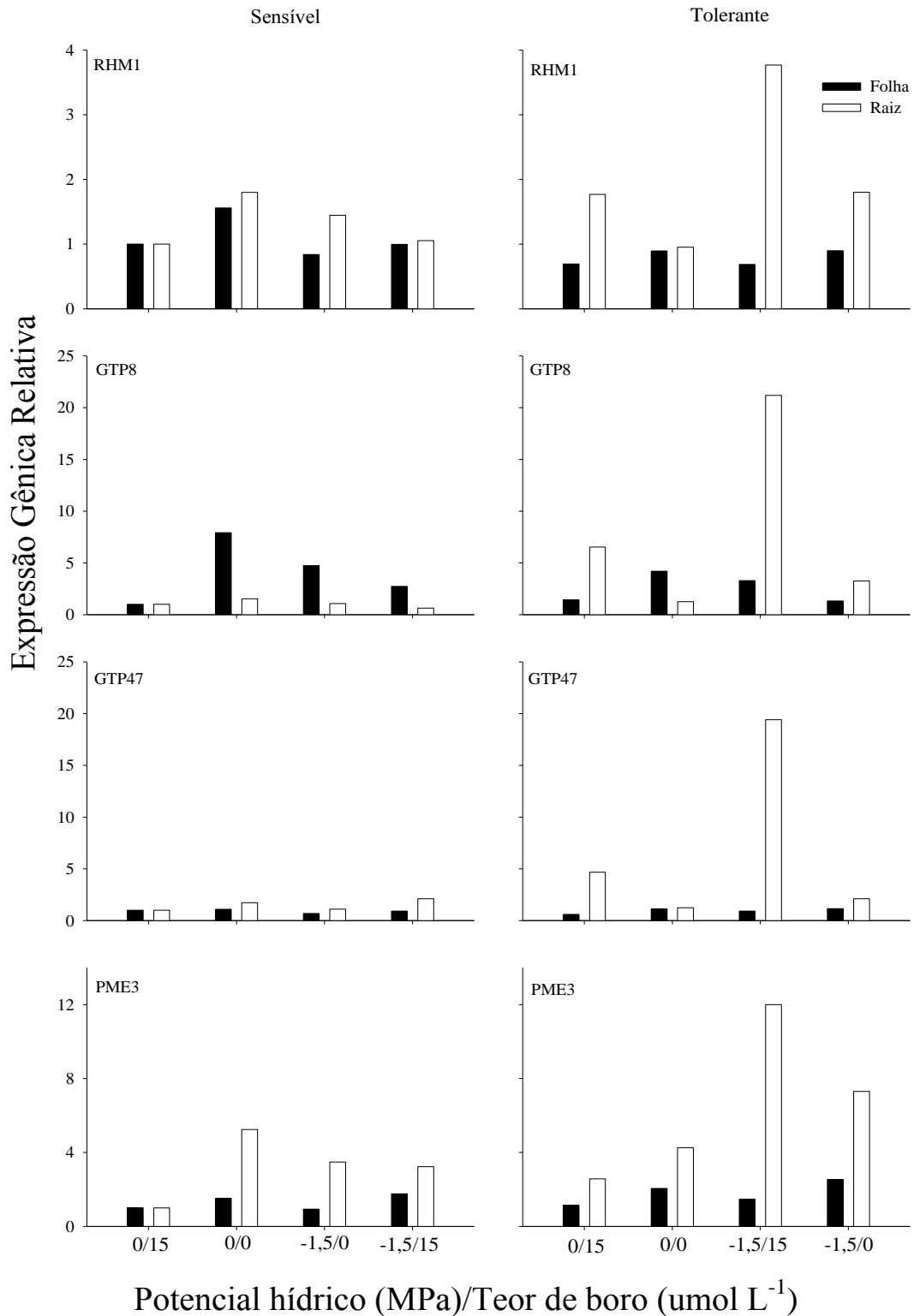


Figura 2. Análise quantitativa da expressão dos genes; dTDP-D-glicose 4,6-dehidratase – Rhamnogalacturonano sintase (RHM1), glicosil-transferase isoforma 8 (GTP8), glicosil-transferase isoforma 47 (GTP47) e pectina metil esterase (PME3) nos clones de eucalipto sensível e tolerante ao déficit hídrico e em resposta a disponibilidade de B e ao déficit hídrico.

Co-expressão dos genes em resposta ao déficit hídrico e disponibilidade de boro

A expressão dos transportadores de polióis, PTrPLT e MAT2, nos tecidos foliares e radiculares, apresentou forte correlação com a expressão do transportador de B - BOR2 na raiz, mas não na folha (Quadro 3). Isso sugere que esse transportador de B é importante no carregamento do xilema, mas não no do floema. Os transportadores de B avaliados neste estudo são classificados como de alta afinidade - do tipo efluxo - e têm importante papel no transporte do B das células do periciclo para o xilema (Takano et al., 2002; Nakagawa et al., 2007). Por sua vez, os dois transportadores de polióis parecem ter importante papel no carregamento do floema, nas folhas, e por favorecer a absorção, pelas células da raiz, desses açúcares-alcoóis. Diferentemente dos genes transportadores de B e polióis, os genes relacionados à síntese de parede celular não apresentaram co-expressão nos tecidos foliares (Quadro 3). Isso indica que, sobre condições de déficit hídrico, situação onde esses genes apresentaram maior expressão relativa (Figura 2), há direcionamento de polióis para o crescimento radicular; possivelmente, como forma de aumentar a capacidade das plantas em absorver água.

Aparentemente, a expressão dos genes RHM1 e PME3 na raiz é dependente do aumento de atividade de transcrição de todos os genes estudados relacionados ao transporte, exceto BOR1 e BOR2 na folha (Quadro 4). O aumento da expressão dos transportadores está envolvido diretamente com o aumento de atividade destes genes na raiz e não na parte aérea, contribuindo então para a realocação dos produtos dos genes de RHM1 e PME7 no crescimento radicular. Maior taxa de crescimento radicular é uma das estratégias que as plantas utilizam para maior aquisição de nutrientes e água, contornado os problemas causados por longos períodos de estiagem (Möttönen et al., 2005). Todavia neste trabalho não foi constatado maior crescimento do sistema radicular em razão da adição de B à solução nutritiva (Capítulo 2); a falta de resposta do sistema radicular à aplicação desse micronutriente pode ser em decorrência do curto período, vinte dias, que as plantas foram cultivadas ausência desse micronutriente. Adicionalmente, a análise química da planta mostrou que o teor de B nos tecidos da plantas encontrava-se nas acima do normalmente encontrado para as plantas de eucalipto (Mattiello et al., 2009b)

Quadro 3. Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de B e polióis, e com a síntese e degradação da parede celular nos clones de eucalipto sensível e tolerante ao estresse hídrico influenciados pela disponibilidade de B e déficit hídrico

		Genes relacionados ao transporte de B e polióis							
		PtrPLT	PtrPLT	Mat 2	Mat 2	BOR1	BOR1	BOR 2	BOR 2
		Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
PtrPLT	Folha	1.000							
PtrPLT	Raiz	0.629	1.000						
Mat 2	Folha	0.660	0.211	1.000					
Mat 2	Raiz	0.853	0.644	0.711	1.000				
BOR1	Folha	-0.075	-0.458	0.595	0.093	1.000			
BOR1	Raiz	0.568	0.687	0.636	0.630	0.243	1.000		
BOR 2	Folha	0.454	-0.305	0.654	0.226	0.630	0.206	1.000	
BOR 2	Raiz	0.853	0.753	0.727	0.954	0.123	0.814	0.240	1.000
		Genes relacionados a síntese e degradação da parede celular							
		GTP8	GTP8	GTP47	GTP47	RHM1	RHM1	PME3	PME3
		Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
GTP8	Folha	1.000							
GTP8	Raiz	-0.114	1.000						
GTP47	Folha	0.184	-0.172	1.000					
GTP47	Raiz	-0.069	0.991	-0.146	1.000				
RHM1	Folha	0.687	-0.479	0.500	-0.438	1.000			
RHM1	Raiz	0.071	0.950	-0.113	0.939	-0.286	1.000		
PME3	Folha	-0.066	-0.064	0.716	-0.068	0.079	-0.018	1.000	
PME3	Raiz	0.151	0.816	0.247	0.820	-0.192	0.889	0.386	1.000

Ponto de corte, 70% de co-expressão

Houve interações negativas entre os genes relacionados ao transporte de B e polióis com o gene RHM1 na folha (Quadro 4). Isso indica que o gene RHM1 na folha pode ser inibido por outro gene que, preferencialmente, se beneficiaria de maior taxa de transporte de B e polióis, ou melhor: os produtos transportados podem ser direcionados para as raízes e onde seriam utilizados.

Dos genes da classe dos transportadores, o BOR2 e o PtrPLT na raiz apresentaram, de forma geral, maior interação com os genes relacionados à síntese de parede celular, sugerindo, novamente, a importância de adequado suprimento de B e polióis na síntese de compostos formadores da parede celular. Adicionalmente, os genes relacionados à síntese de parede estão mais co-expressos nos tecidos radiculares, provavelmente pela disponibilidade de substrato prontamente disponível ou pelas condições de baixa disponibilidade de água para crescimento da parte aérea favorecendo, assim, o crescimento do sistema radicular (Quadro 3). Os genes de ambos os grupos, transportadores de B e síntese de parede celular, apresentaram melhor co-expressão quando se tomam como base os valores de expressão gênica relativa referente aos tecidos radiculares (Quadros 3 e 4). De modo geral, os genes dos dois grupos apresentaram boa taxa de co-expressão, indicando a necessidade de B e de polióis na síntese da parede celular. Conforme já discutido, o B está relacionado com a estruturação dos compostos pécicos, e os polióis podem servir de esqueleto carbônico ou fonte de energia ao metabolismo.

Os genes estudados apresentaram maior expressão diferencial nos tecidos radiculares do clone tolerante, quando cultivados na presença de B e restrição hídrica (Quadro 5). Nenhum dos genes estudados apresentou expressão gênica significativa no clone sensível ou em tecidos foliares, com exceção do gene glicosiltransferase 8 (GTP8) que apresentou elevada taxa de expressão gênica nos tecidos foliares do clone sensível (Quadro 5). Esses resultados sugerem que a tolerância diferencial ao déficit hídrico por esses clones pode estar relacionada com a maior capacidade de transporte de polióis e B, como substrato para a síntese de parede celular, no clone tolerante. A RGII, substância pécica componente da parede celular, apresenta resíduos de D-apiose em sua estrutura que favorece a formação de ligações B-diéster (O'Neill et al., 1996). Esta ligação é responsável pela manutenção da integridade da cadeia desse composto pécico. O fato destes genes mostrarem maior expressão diferencial nas plantas cultivadas sob restrição hídrica é mais um indicativo de sua participação na tolerância a déficit hídrico.

Quadro 4. Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de íons e compostos orgânicos com interação com genes relacionados a síntese e degradação da parede celular, nos clones de eucalipto sensível e tolerante ao déficit hídrico e em resposta à disponibilidade de B e déficit hídrico

	RHM 1 Folha	RHM 1 Raiz	GTP8 Folha	GTP8 Raiz	GTP47 Folha	GTP47 Raiz	PME3 Folha	PME3 Raiz
PLT Folha	-0,447	0,724	-0,177	0,690	0,220	0,658	0,575	0,890
PLT Raiz	-0,544	0,892	-0,165	0,976	-0,257	0,951	-0,112	0,718
MaT2 Folha	0,354	0,524	0,505	0,318	0,580	0,318	0,611	0,773
MaT2 Raiz	-0,194	0,817	-0,043	0,703	0,205	0,647	0,314	0,843
BOR1 Folha	0,716	-0,207	0,740	-0,439	0,443	-0,457	0,311	-0,005
BOR1 Raiz	-0,071	0,802	0,515	0,698	-0,136	0,683	0,016	0,759
BOR2 Folha	0,151	-0,094	0,322	-0,240	0,471	-0,244	0,771	0,309
BOR2 Raiz	-0,227	0,876	0,109	0,785	0,123	0,734	0,270	0,892

Ponto de corte, 70% de co-expressão.

Quadro 5. Classificação dos genes segundo a expressão gênica relativa elaborada a partir das análises de cluster pela MANOVA em grupamentos hierárquicos

Classificação		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
Ψ_w	Boro $\mu\text{mol L}^{-1}$	GTP8 (r)35	GTP47 (r) 35	PME7 (r) 35	GTP8 (f) 34	PLT (f) 35	PLT (r) 35	BOR2 (r) 35	BOR1 (r) 35	RHM1 (r) 35
0	15	6,527	4,673	2,572	1,000	2,349	3,492	2,040	2,362	1,769
0	0	1,250	1,247	4,251	7,911	2,868	1,488	1,795	2,171	0,953
-1,5	15	21,178	19,405	11,996	4,743	5,291	6,518	3,751	3,337	3,769
-1,5	0	3,245	2,111	7,305	2,733	5,044	1,335	2,849	1,986	1,802

Uma aproximação das relações entre os genes envolvidos com o transporte de B e polióis com aqueles envolvidos na síntese de parede na tolerância a deficiência de B e ao déficit hídrico seria: primeiro – os genes relacionados ao transporte de polióis e B propiciariam tolerância à deficiência de B, por favorecer maior absorção e remobilização de B e açúcares. A maior remobilização desse nutriente permitiria suprimento mais uniforme, entre as estações do ano, às regiões meristemáticas, com maior demanda metabólica por B, prevenindo a seca de ponteiros, ou seja, má formação

da parede celular em regiões meristemáticas. Desta forma, na estação seca, época do ano quando o transporte de B no solo é bastante reduzido em razão da limitada disponibilidade de água (Mattiello et al., 2009b) e os sintomas de sua deficiência são mais visíveis, haveria transferência desse nutriente das folhas velhas, crescidas na estação chuvosa, o que propicia o suprimento adequado de B para regiões meristemáticas; segundo – a ação dos genes de ambas as classes propiciaria maior tolerância ao déficit hídrico (Figura 3). A maior expressão do gene BOR1 nas plantas cultivadas na presença de B e sob déficit hídrico favoreceria o acúmulo de B na parte aérea (Figura 3), principalmente, nos períodos que o baixo conteúdo de água do solo limita o transporte desse nutriente e manutenção de altas taxas transpiracionais. O acúmulo de B na parte aérea sinaliza, nas plantas cultivadas sob restrições hídricas, maior expressão dos genes envolvidos no transporte de polióis, nos tecidos foliares e radiculares. A maior atividade dos transportadores de polióis nas folhas propiciaria maior carregamento do floema (Noiraud et al., 2001) permitindo a redistribuição de complexo B-poliól (Figura 3). O descarregamento do floema nos tecidos radiculares seria facilitado pela maior expressão dos genes PTrPLT e MaT2 nesses tecidos (Juchaux-Cachau et al., 2007). Como já discutido, esses transportadores podem estar envolvidos na síntese de parede celular por propiciar adequado suprimento de C orgânico como fonte de energia e, ou, esqueleto carbônico (Klepek et al. 2010). Dessa forma, a maior disponibilidade de polióis e de B nos tecidos favorece maior atividade dos produtos dos genes envolvidos na síntese de parede celular. Os polióis supririam a demanda por C-orgânico e o B favoreceria a síntese de substâncias pécticas, dado sua capacidade de formar ligações boro-diéster, responsáveis pela dimerização de compostos pécticos ramnogalacturonanos (O'Neill et al., 1996; Ishii et al., 2001). Diante do exposto, espera-se que a ação conjunta desses genes, em clones de eucalipto cultivados sob déficit hídrico e na presença de B, contribua para maior crescimento do sistema radicular, resultando em menor relação raiz:parte aérea, contribuindo para maior aquisição de água e nutrientes em condições de baixa disponibilidade.

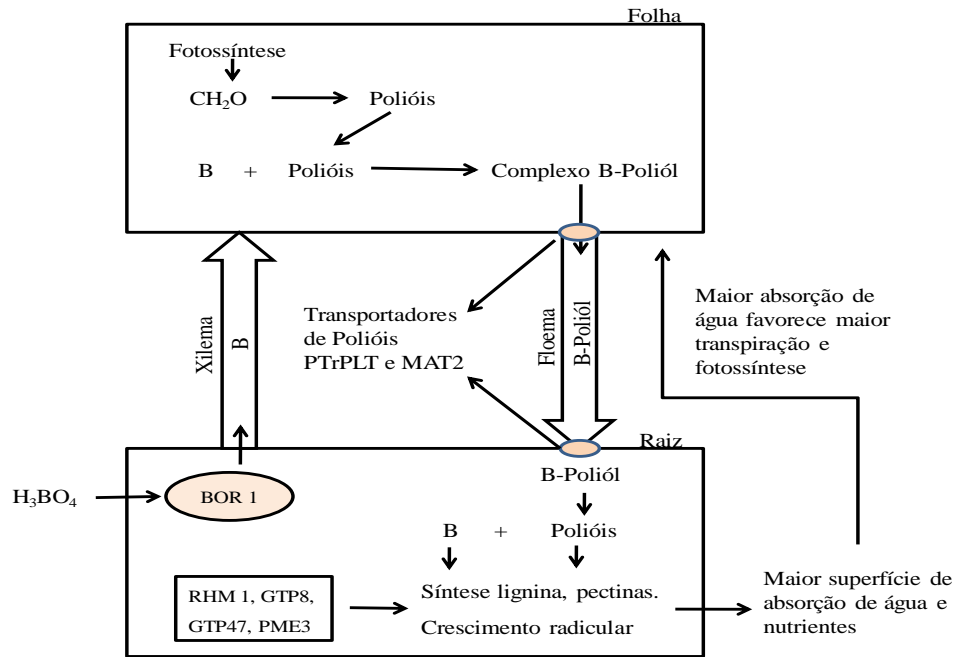


Figura 3. Esquema das relações dos genes transportadores de B e polióis com os genes relacionados à síntese de parede celular e com o crescimento radicular em clone de eucalipto, tolerante ao déficit hídrico, cultivado sob estresse hídrico e presença de B.

CONCLUSÕES

- Os genes transportadores de polióis (PtrPLT, Mat2), transportadores de B (BOR1 e BOR2), dTDP-D-glicose 4,6-dehidratase – Rhamnogalacturonano sintase (RHM1), glicosil-transferase isoforma 8 (GTP8), glicosil-transferase isoforma 47 (GTP47) e pectina metil esterase (PME3) apresentaram maior expressão relativa no clone tolerante ao déficit hídrico.
- A presença de B na solução nutritiva induziu maior expressão gênica apenas no clone tolerante ao déficit hídrico, quando cultivado com condição de limitada disponibilidade de água.
- Foi detectada maior expressão dos genes relacionados à síntese de parede celular, em relação à dos genes relacionados ao transporte de polióis e B na planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI-BENALI, M.A.; ALARY, R.; JOUDRIER, P. & GAUTIER, M.F. Comparative expression of five *Lea* genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR, *Biochem. Biophys. Acta Gene Structure Experiment*, 1730:56–65, 2005.
- ANDERSON, J.E.; WILLIAMS, J.; KRIEDEMANN, P.E.; AUSTIN, M.P. & FARQUHAR, G.D. Correlations between carbon isotope discrimination and climate of native habitats for diverse eucalypt taxa growing in a common garden. *Aust. J. Plant Physiol.*, 32:311-320, 1996.
- ARAUS, J.L.; SLAFER, G.A.; REYNOLDS, M.P. & ROYO, C. Plant breeding and drought in C-3 cereals: What should we breed for?" *Annals of Botany* 89: 925-940, 2002.
- BELLALLOUI, N.; BROWN, P.H. & DANDEKAR, A.M. Manipulation of in vivo sorbitol production alters boron uptake and transport in tobacco. *Plant Physiol.*, 119:735-741, 1999.
- BLUM, A. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilisation (Reprinted from *Wheat: Prospects for global improvement. Euphytica*, 100:77-83, 1998
- BLUM, A.; ZHANG, J. & NGUYEN, H.T. Consistent differences among wheat cultivars in osmotic adjustment and their relationship to plant production. *Field Crops Research*, 64:287-291, 1999.
- BROWN, P.H. & HU, H. Phloem mobility of boron is species dependent. Evidence for phloem mobility in sorbitol rich species. *Ann. Botany*, 77:497-505, 1996.
- BOLAÑOS, L.; LUKASZEWSKI, B.; BONILLA, I. & BLEVINS, D. Why Boron?. *Plant Physiol. Biochem.*, 42:907-912, 2004.
- BOUTON, S.; LEBOEUF, E.; MOUILLE, G.; LEYDECKER, M.-T.; TALBOTEC, J.; GRANIER, F.; LAHAYE, M.; HOFTE, H. & TRUONG, H.-N. QUASIMODO1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14:2577–2590, 2002.
- CAKMAK, I.; KURTZ, H. & MARSCHNER, H. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.*, 95:11-18, 1995.
- CAKMAK, I. & RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193:71-83, 1997.
- CHAMBERS, P.G.S. & BORRALHO, N.M.G. Importance of survival in short-rotation tree breeding programs. *Can. J. For. Res.*, 27:911-917, 1997.

- CHEN, L.S. & CHENG, L. Both xanthophylls cycle-dependent thermal dissipation and the antioxidant system are up-regulated in grape (*Vitis labrusca* L. cv. Concord) leaves in response to N limitation. *J. Exp. Bot.*, 54:2165-2175, 2003.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphates in intact maize root. *J. Agric. Food Chem.* 23:458-460, 1975.
- CONDON, A.G.; RICHARDS, R.A.; REBETZKE, G.J. & FARGUHAR, G.D. Breeding for high water use efficiency. *J. Exp. Bot.*, 55:2447-2460, 2004.
- DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; PINHEIRO, H.A.; DUACTTI, C. & LOUREIRO, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Sci.*, 164:111-117, 2003.
- DELL, B. & MALAJCZUK, N Boron deficiency in eucalypt plantations in China. *Can. J. For. Res.*, 24:2409-2416, 1994.
- DELMAS, F.; SÉVENO, M.; NORTHEY, J.G.B.; HERNOULD, M.; LEROUGE, P.; MCCOURT, P. & CHEVALIER, C. The synthesis of the rhamnogalacturonan II component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation. *J. Exp. Bot.*, 59:2639-2647, 2008
- DUCREY, M.; HUC, H.; LADJAL, M. & GUEHL, J.M. Variability in growth, carbon isotope composition, leaf gas exchange and hydraulic traits in the eastern Mediterranean cedars *Cedrus libani* and *C. brevifolia*. *Tree Physiol.*, 28:689-701, 2008.
- FARQUHAR, G.D.; EHLERINGER, J.R. & HUBICK, K.T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40:503-537, 1989.
- GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K. & MUEN, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production?. *Trends Plant Sci.*, 9:597-605, 2004.
- HAN, S.; CHEN, L.S.; JIANG, H.X.; SMITH, B.R.; YANG, L.T. & XIE, C.Y. Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings. *J. Plant Physiol.*, 165:1331-1341, 2008
- HENZLER, T.; YE, Q. & STEUDLE, E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant Cell Environ.*, 27:1184-1195, 2004.
- HOLLAND, M. J. "Transcript abundance in yeast varies over six orders of magnitude." *J. Biological Chem.*, 277:14363-14366, 2002.
- HONEYSETT, J.L.; BEADLE, C.L. & 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.
- IMPA, S.M.; NADARADJAN, P.; BOOMINATHAN, P.; SHASHIDHAR, G.; BINDUMADHAVA, H. & SHESHSHAYEE, M.S. Carbon isotope discrimination

- accurately reflects variability in WUE measured at a whole plant level in rice. *Crop Sci.*, 45:2517-2522, 2005.
- ISHII, T.; MATSUNAGA, T. & HAYASHI, N. Formation of rhamnogalacturonan II-borate dimer in pectin determines cell Wall Thickness of Pumpkin Tissue. *Plant Physiol.*, 126:1698-1705, 2001.
- ISHIKAWA, M.; KUROYAMA, H.; TAKEUCHI, Y. & TSUMURAYA, Y. Characterization of pectin methylesterase from soybean hypocotyls. *Planta*, 210:782-791, 2000.
- JUCHAUX-CACHAU, M.; LANDOUAR-ARSIVAUD, L.; PICHAUT, J.P.; CAMPION, C.; PORCHERON, B.; JEAUFFRE, J.; NOIRAUD-ROMY, N.; SIMONEAU, P.; MAUROUSSET, L. & LEMOINE, R. Characterization of AgMaT2, a plasma membrane mannitol transporter from celery, expressed in phloem cells, including phloem parenchyma cells. *Plant Physiol.*, 145:62-74, 2007.
- KLEPEK, Y.S., GEIGER, D.; STADLER, R.; KLEBL, F.; LANDOUAR-ARSIVAUD, L.; LEMOINE, R.; HEDRICH, R. & SAUER, N. arabidopsis polyol transporter 5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H⁺-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell*. 17:204-218, 2005.
- KLEPEK, Y.S.; VOLKE, M.; KONRAD, K.R.; WIPPEL, K.; HOTH, S.; HEDRICH R. & SAUER, N. Arabidopsis thaliana polyol/monosaccharide transporters 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *Exp. Botany*, 61:537-550, 2010.
- KOBAYASHI, M.; MUTOH, T. & MATOH, T. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. IV. Genes induced under low boron supply. *J. Exp. Bot.*, 55:1441-1443, 2004.
- KOSHIBA, T.; KOBAYASHI, M. & MATOH, T. Boron Nutrition of Tobacco BY-2 Cells. V. Oxidative Damage is the Major Cause of Cell Death Induced by Boron Deprivation. *Plant Cell Physiol.*, 50:26-36, 2009.
- LAWSON, T.; OXBOROUGH, K.; MORISON, J.I.L. & BAKER, N.R. The responses of guard and mesophyll cell photosynthesis to CO₂, O₂, light and water stress in a range of species are similar. *J. Exp. Bot.*, 54:1743-1752, 2003.
- LEHTO, T.; LAVOLA, A.; JULKUNEN-TIITTO, R. & APHALO, P.J. Boron retranslocation in Scots pine and Norway spruce. *Tree Physiology* 24(9): 1011-1017, 2004
- LI, C.; BERNINGER, F.; KOSKELA, J. & 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.

- LOOMIS, W.D. & DURST, R.W. Chemistry and Biology of Boron. *Biofactors* 3:229-239, 1992.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, San Diego, CA. 1986, 681p.
- MATTIELLO, E.M.; RUIZ, H.A.; SILVA, I.R.; SARKIS, J.E.S.; NEVES, J.C.L. & PUCCI, M.M. Mobilidade floemática de Boro em dois clones de eucalipto. *Ver. Bras. Ci.Solo*, 33:1695-1704, 2009a.
- MATTIELLO, E.M.; RUIZ, H.A.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; NEVES, J.C.L. & BEHLING, M. Transporte de boro no solo e sua absorção por eucalipto. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 33:1281-1290, 2009b.
- MIWA, K.; TAKANO, J. & FUJIWARA, T. Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of BOR1, a boron transporter for xylem loading, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 46:1084-1091, 2006.
- MONNEVEUX, P.; SHESHSHAYEE, M.S.; AKTHER, J. & RIBAUT, J.M. Using carbon isotope discrimination to select maize (*Zea mays* L.) inbred lines and hybrids for drought tolerance. *Plant Sci.*, 173:390-396, 2007.
- MÖTTÖNEN, M.; APHALO, P.J & LEHTO, T. Role of boron in drought resistance in Norway spruce (*Picea abies*) seedlings *Tree Physiol.*, 21:673-681, 2001.
- MÖTTÖNEN, M.; LEHTO, T.; RITA, H. & APHALO, P.J. Recovery of Norwar spruce (*Picea abies*) seedlings form repeated drought as affected by boron nutrition. *Trees*, 19:213-223, 2005.
- NAKAGAWA, Y.; HANAOKA, H.; KOBAYASHI, M.; MIYOSHI, K.; MIWA, K. & FUJIWARA, T. Cell-Type Specificity of the Expression of Os *BOR1*, a Rice Efflux Boron Transporter Gene, Is Regulated in Response to Boron Availability for Efficient Boron Uptake and Xylem Loading. *Plant Cell*, 19:2624-2635, 2007.
- NICOT, N.; HAUSMAN, J.; HOFFMANN, L. & EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, 56:2907-2914, 2005.
- NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L. & FOYER, C.H. Drought and oxidative load in leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annal. Bot.*, 89:841-850, 2002.
- NOIRAUD, N.; MAUROUSSET, L. & LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:717-728, 2001.
- NUNES, F.N.; CANTARUTTI, R.B.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R.; RIBEIRO, B.N. Atividade de fosfatases em gramíneas forrageiras em resposta à disponibilidade de fósforo no solo e à altura de corte das plantas. *Ver. Bras. Ci. Solo*, 32:1899-1909, 2008.
- OERTLI, J.J. The mobility of boron in plants. *Plant Soil*, 155/156:301-304, 1993.

- O'NEILL, M.A.; ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: DEY, P.M., ed. Methods in plant biochemistry, vol. 2, Academic Press, 1990, p.415-491.
- O'NEILL, M.A.; EBERHARD, S.; ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth. *Sci.*, 294:846-849, 2001.
- O'NEILL, M.A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall polysaccharide. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:109-139, 2004.
- O'NEILL, M.A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *J Biol Chem.*, 271:22923-30, 1996.
- PITA, P.; SORIA, F.; CANAS, I.; TOVAL, G. & PARDOS, J.A. Carbon isotope discrimination and its relationship to drought resistance under field conditions in genotypes of *Eucalyptus globulus* Labill. *For. Eco. Manag.*, 141:211-221, 2001.
- POMMERENIG, B.; PAPINI-TERZI, F.S. & SAUER, N. Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of plantago major in response to salt stress. *Plant Physiol.*, 144:1029-1038, 2007.
- READ, J.J.; JOHNSON, D.A.; ASAY, K.H. & TIENZEN, C. Carbon isotope discrimination, gas exchange and WUE in crested wheat grass clones. *Crop Sci.*, 31:1203-1208, 1991.
- REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V. & VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism on higher plants. *J. Plant Physiol.*, 161:1189-1202, 2004.
- ROBERTS S. K. Regulation of K⁺ channels o in maize roots by water stress and abscisic acid. *Plant Physiol.*, 116:145-153, 1998.
- RUIZ, J.M.; RIVERO, R.M. & ROMERO, L. Boron increases synthesis of glutathione in sunflower subjected to aluminum stress. *Plant Soil*, 279:25-30, 2006.
- SGARBI, F.; SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N. & CAMARGO, M.A.F. Crescimento e produção de biomassa de clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em condições de deficiência de macronutrientes, B e Zn. *Sci. Florestalis*, 56:69-82, 1999.
- SHESHSHAYEE, M.S.; BINDUMADHAVA, H.; SHANKAR, A.G.; PRASAD, T.G. & UDAYAKUMAR, M. Breeding strategies to exploit water use efficiency for crop improvement. *J. Plant Biol.*, 30:253-268, 2003.
- SHORROCKS, V.M. The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant Soil*, 193:121-148, 1997.

- SILVA, D.H.; ROSSI, M.L.; BOARETTO, A.E.; NOGUEIRA, N.L. & MURAOKA, T. Boron affects the growth and utrastructure of castor bean plants. *Sci. Agric.*, 65:659-664, 2008.
- STATSOFT. STATISTICA 8.0 Software Version Trail. <https://www.statsoft.com/secure/statistica8trial.html>. Acessado em jan 2010.
- STILLER, W.N.; READ, J.J.; CONSTABLE, G.A. & REID, P.E. Selection for Water Use Efficiency Traits in a Cotton Breeding Program. *Crop Sci.*, 45:1107-1113, 2005.
- TAKANO, J., MIWA, K., YUAN, L., von WIRÉN, N., & FUJIWARA, T. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102:12276–12281, 2005.
- TAKANO, J.; NOGUCHI, K.; YASUMORI, M.; KOBAYASHI, M.; GAJDOS, Z.; MIWA, K.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. & FUJIWARA, T. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420:337-340, 2002
- TAKANO, J.; WADA, M.; LUDEWIG, U.; SCHAAF, G.; von WIREN, N. & FUJIWARA, T. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, 18:1498-1509, 2006.
- TANAKA, M. & FUJIWARA, T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Eur. J. Physiol.*, 465:671-677, 2008.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3:1-12, 2002.
- WANG, X.; TIAN, W. & LI, Y. Development of an Efficient Protocol of RNA Isolation from recalcitrant Tree Tissues. *Mol Biotechnol.*, 38:57–64, 2007.
- WILSON, K. & WALKER, K. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 5a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.784 p.
- WOLF, B. Improvement in the azometine-H method for determination of boron. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 5:39-44, 1974.
- YIN, C.; PANG, X. & CHEN, K. The effects of water, nutrient availability and their interaction on the growth, morphology and physiology of two poplar species. *Environ. Exp. Bot.*, 67:196-203, 2009.
- YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y. & MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is a early symptom by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea poots. *Plant Physiol.*, 125:199-208, 2001.
- YANCEY, P. H. Water stress, osmolytes and proteins. *Integrative & Comparative Biol.*, 41:699-709, 2001.

- ZENG, C.; XU, F.; WANG, Y.; HU, C. & MENG, J. Physiological basis of QTLs for boron efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 296:187-196, 2007.
- ZHANG, J.; FINS, L. & MARSHALL, J.D. Stable carbon isotope discrimination, photosynthetic gas exchange, and growth differences among western larch families. *Tree Physiol.*, 14:531-539, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

Os clones mais tolerantes apresentaram menores valores de discriminação isotópica do ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$), mortalidade e maior produtividade. A $\Delta^{13}\text{C}$ em árvores com cinco anos de idade pode ser utilizada como indicador de genótipos tolerantes à seca quando cultivados sob baixa disponibilidade de água. Em condições controladas, a adição de B à solução nutritiva propiciou maior produção de matéria seca, taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração, nos clone sensível e tolerante ao déficit hídrico, independente da disponibilidade de B. Porém, em condições de limitada disponibilidade hídrica, a adição de B à solução nutritiva propiciou incremento de 50 % na produção de matéria seca pela parte aérea do clone tolerante, enquanto no clone sensível esse incremento foi de apenas 23 %. Isso sugere que este micronutriente favorece a ativação de mecanismo(s) de defesa contra déficit hídrico. Os genes transportadores de poliol (PtrPLT, Mat2), transportadores de B (BOR1 e BOR2), dTDP-D-glicose 4,6-dehidratase – Rhamnogalacturonano sintase (RHM1), glicosil-transferase isoforma 8 (GTP8), glicosil-transferase isoforma 47 (GTP47) e pectina metil esterase (PME3) apresentaram maior expressão relativa no clone tolerante ao déficit hídrico. A adição de B à solução nutritiva propicia maiores valores de expressão relativa para estes genes. Adicionalmente, há maior expressão dos genes relacionados à síntese de parede celular, em relação à dos genes relacionados ao transporte de polióis e B na planta, indicando a importância da síntese de parede celular na tolerância diferencial ao estresse hídrico.

APÊNDICE

Quadro A1. Análise da expressão dos genes transportador de polióis (PtrPLT), transportador de manitol (MaT2), transportador de boro (BOR1 e BOR2) por PCR em tempo real nos clones sensível e tolerante à seca em resposta à disponibilidade de boro e água em solução nutritiva

Clone	Ψ_w	Boro	PtrPLT	MaT2	BOR1	BOR2
	- MPa -	- μM -	-----CT méd-----			
	-----Folha-----					
Sensível	0	15	30.49 (0,32) A	27.80 (0,78) A	25.56 (0,00) A	25.85 (0,72) A
	0	0	29.64 (1,04) B	26.81 (0,27) B	24.23 (0,21) B	25.02 (0,24) B
	-1,5	15	29.03 (0,77) B	26.95 (0,32) A	24.50 (0,47) A	24.68 (0,58) A
	-1,5	0	29.07 (0,50) B	26.96 (0,29) A	25.02 (0,30) A	24.76 (0,80) A
Tolerante	0	15	28.51 (0,26) B	26.92 (0,53) A	24.65 (0,18) A	24.84 (0,60) A
	0	0	28.52 (0,27) B	26.78 (0,47) A	24.37 (0,42) B	24.58 (0,87) B
	-1,5	15	27.55 (0,40) D	26.48 (0,39) B	25.12 (0,30) A	24.86 (0,67) A
	-1,5	0	27.78 (0,22) D	26.66 (0,29) B	24.48 (0,09) B	24.53 (0,73) B
	-----Raiz-----					
Sensível	0	15	29.03 (1,24) A	29.78 (0,32) A	27.81 (0,76) A	31.80 (0,31) A
	0	0	29.24 (0,93) A	29.47 (0,14) A	26.49 (0,51) C	30.75 (0,50) C
	-1,5	15	29.74 (1,41) A	30.12 (0,29) A	27.09 (0,49) C	31.52 (0,38) C
	-1,5	0	29.10 (0,89) A	29.73 (0,29) A	26.49 (0,39) A	31.73 (0,32) A
Tolerante	0	15				B B
			27.27 (1,80) C	29.57 (0,20) A	26.65 (0,48)	30.83 (0,22)
	0	0	28.31 (1,91) A	29.61 (0,24) A	26.59 (0,12) B	30.76 (0,35) B
	-1,5	15	26.04 (1,48) E	28.50 (0,20) B	25.91 (0,20) C	29.64 (0,37) C
	-1,5	0	28.10 (1,60) A	28.36 (0,33) A	26.37 (0,61) B	29.84 (0,25) B

Letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre a determinação de Ct médio dos transcritos pelo teste Scott-Knot a 5 % de probabilidade.

Quadro A2. Análise da expressão dos genes pectina-acetil-esterase (PAE2), glicosil-transferase isoforma 8 e 47 (GTP8 e GTP47), dTDP-D-glicose 4,6-dehidratase – Rhamnogalacturonano sintase (RHM1) e pectina metil esterase (PME3) por PCR em tempo real, nos clones sensível e tolerante à seca em resposta à disponibilidade de boro e água em solução nutritiva

Clone	Ψ_w	Boro	RHM1	GTP8		GTP47		PME3		
	MPa	μM	-----CT méd-----							
			Folha							
Sensível	0	15	22.49 (0,28)	A	29.91 (0,35)	A	26.44 (0,60)	A	23.10 (0,64)	A
	0	0	21.68 (0,33)	B	26.90 (1,00)	D	26.18 (0,91)	A	22.35 (0,94)	B
	-1,5	15	22.33 (0,27)	A	27.50 (1,19)	C	26.51 (0,43)	A	22.74 (0,69)	A
	-1,5	0	21.99 (0,21)	A	27.96 (0,38)	B	26.08 (0,84)	A	21.72 (0,38)	B
Tolerante	0	15	22.30 (0,42)	A	28.68 (0,60)	A	26.46 (0,82)	A	22.17 (0,74)	A
	0	0	22.22 (0,36)	A	27.46 (0,69)	C	25.86 (0,96)	A	21.56 (0,45)	B
	-1,5	15	22.50 (0,31)	A	27.76 (0,86)	B	25.99 (0,52)	A	22.00 (0,79)	A
	-1,5	0	22.28 (0,12)	A	29.21(0,78)	A	25.86 (0,32)	A	21.38 (0,27)	C
			Raiz							
Sensível	0	15	29.14 (0,97)	A	30.12 (1,51)	A	26.65 (1,20)	A	29.44 (0,88)	A
	0	0	28.47 (0,46)	B	29.62 (1,56)	A	26.00 (1,60)	A	27.16 (0,95)	E
	-1,5	15	29.04 (0,93)	B	30.43 (1,67)	A	27.00 (0,84)	A	28.04 (1,01)	D
	-1,5	0	28.36 (0,54)	A	30.15 (0,84)	A	25.16 (0,14)	B	26.90 (0,91)	D
Tolerante	0	15	28.46 (0,48)	B	27.62 (0,83)	D	24.51 (0,88)	C	28.27 (0,07)	C
	0	0	29.04 (0,77)	A	29.65 (1,19)	A	26.11 (1,35)	A	27.15 (0,82)	E
	-1,5	15	27.06 (0,52)	C	25.78 (0,49)	E	22.24 (0,62)	D	25.59 (1,37)	G
	-1,5	0	27.89 (0,60)	B	28.13 (0,84)	C	25.11 (1,00)	B	26.11 (0,73)	F

Letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre a determinação de Ct médio dos transcritos. ANOVA fatorial com separação de médias pelo teste Scott-Knot a 5%.