

BÁRBARA ELIAS DOS REIS

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA DO EUCALIPTO À  
SECA INFLUENCIADA PELO BORO**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2011

BÁRBARA ELIAS DOS REIS

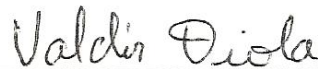
**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA DO EUCALIPTO À  
SECA INFLUENCIADA PELO BORO.**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

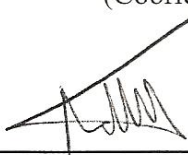
APROVADA: 18 de fevereiro de 2011.



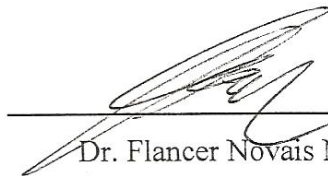
Prof. Ivo Ribeiro da Silva  
(Coorientador)



Prof. Valdir Diola



Prof. Edson Marcio Mattiello



Dr. Flancer Novais Nunes



Prof. Nairam Félix de Barros  
(Orientador)

*Aos meus pais Geraldo Tadeu e Carla Betânia,*

*Ao meu irmão Thomás,*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

Aos meus pais Geraldo Tadeu dos Reis e Carla Betânia Elias dos Reis por todo o amor, carinho, dedicação, educação, esforço, incentivo e ensino de vida.

Ao meu irmão Thomás Elias dos Reis pelos bons momentos vividos juntos.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização da graduação e ao Departamento de Solos e Nutrição de Plantas pelos ensinamentos acadêmicos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Nairam Félix de Barros pela orientação, confiança, críticas, sugestões incentivo e amizade durante a realização desse trabalho.

Ao Professor Valdir Diola, pela amizade, pela presença tanto durante a execução do experimento como nas análises e por toda a contribuição profissional.

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

Ao Professor Marcelo Ehlers Loureiro pela prontidão, competência e importantes sugestões.

Ao Professor Júlio César Lima Neves pela ajuda valiosa e amizade.

Ao Professor Haroldo Nogueira de Paiva pelos ensinamentos e amizade.

Ao Professor Edson Marcio Mattiello e Dr. Flancer Novais Nunes pelas valiosas sugestões nas correções deste trabalho.

Aos grandes amigos Rita, Vanessa, Natália, Marino, Eliziane e Delmar, pelo apoio e amizade sempre presentes.

Aos amigos e colegas de curso, Jarbas, Héilton, David, Ricardo, Loane, Éllen, Bruno, Lorena, Fernanda, Aline, Anderson, Ingrid, Ivan, Adebayo, Manuel e Gracinha, pelos bons momentos.

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

A todos os estudantes do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas pela recepção e carinho, em especial Flancer, Carol, Ivan, Dani e Sol.

A todos os funcionários do DPS, em especial, a Luciana, Cardoso, Beto, João Milagres e Reginaldo.

Ao Thiago, que mesmo de longe, compartilhou comigo os bons momentos e me ajudou durante os momentos difíceis.

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

## **BIOGRAFIA**

BÁRBARA ELIAS DOS REIS, filha de Geraldo Tadeu dos Reis e Carla Betânia Elias dos Reis, nasceu em Caetanópolis, Minas Gerais, no dia 11 de junho de 1987.

Em março de 2005, ingressou em Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, graduando-se em julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, submetendo-se à defesa de tese no dia 18 de fevereiro de 2011.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
2.1 Crescimento das plantas e tratamento com déficit hídrico.....	4
2.2 Expressão gênica .....	6
2.3 Análises Estatísticas .....	9
RESULTADOS .....	10
3.1 Potencial hídrico foliar .....	10
3.2 Teores de boro e matéria seca.....	11
3.3 Expressão relativa de genes relacionados ao transporte de B e síntese e alteração de parede celular.....	19
3.4 Co-expressão dos genes em resposta ao déficit hídrico e disponibilidade de B.....	22
DISCUSSÃO .....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28

## RESUMO

REIS, Bárbara Elias dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.  
**Expressão de genes relacionados à tolerância do eucalipto à seca influenciada pelo boro.**  
Orientador: Nairam Félix de Barros. Co-orientadores: Ivo Ribeiro da Silva e Marcelo Ehlers Loureiro

Com a valorização das áreas de cultivo de culturas agrícolas e a redução de áreas disponíveis, o eucalipto passou a ocupar as áreas marginais como as regiões com baixa pluviosidade e solos com baixa capacidade de retenção de umidade e baixa fertilidade. No período de seca, as plantas são submetidas ao déficit hídrico e os principais sintomas normalmente observados são a seca dos ponteiros, decorrente da deficiência de boro (B), seguida do lançamento de brotação lateral, e, ou, dessecação de folhas, da base para o ápice das árvores. A intensidade desse sintoma e os distúrbios observados são genótipo-dependentes sendo um indicativo de tolerância diferencial à seca em eucalipto. Além das principais funções do B, tem-se observado que o suprimento adequado de B em períodos de seca mantém a taxa de crescimento além de aumentar a expressão de genes de síntese de parede e transportadores de B, sendo particularmente maior em raízes, de clone de *Eucalyptus sp.* tolerante à seca. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se avaliar a contribuição do B na transcrição diferencial de genes relacionados à síntese e alteração de parede celular (PME3 e GTP8), absorção e transporte do B (BOR cl6871, BOR5 e BOR2) em genótipo de eucalipto submetido ao estresse hídrico. Para isso, quatro mudas de um clone de *Eucalyptus urophylla* tolerante à seca foram aclimatadas em solução nutritiva de Clark (Clark 1975) com pH 5,5 e disponibilidade de  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) igual a  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em 24 bandejas com 10 L de solução sob constante aeração. Após 30 dias em condições de casa de vegetação, separaram-se as



plantas em dois grupos. Em dezesseis bandejas, as plantas foram mantidas em solução de Clark, sem B na solução, e em oito bandejas elas foram crescidas em solução com  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) durante 25 dias. Após este período, doses crescentes de polietilenoglicol (PEG) 6000 (0, 100, 200, 250 e 360 g/L) foram adicionadas a cada cinco dias para reduzir gradativamente o potencial hídrico da solução à 0, -0,15; -0,65; -1,00 e -1,5MPa, respectivamente, nos devidos tratamentos. Após a aplicação da primeira dose de PEG foi retirado o B nos tratamentos onde este ainda se encontrava presente na solução. Assim, os tratamentos se constituíram de: a) plantas sem déficit hídrico e ausência de B em solução, b) plantas sem déficit hídrico e com suprimento adequado de B na solução, c) plantas com déficit hídrico e ausência de B na solução, d) plantas com déficit hídrico e com suprimento adequado de B. Dois tratamentos adicionais foram utilizados: o primeiro com déficit hídrico, ausência de B na solução e aplicação foliar de  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) em folha madura e o segundo semelhante ao primeiro, mas com a aplicação de  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) à folha jovem. O estresse hídrico e ausência de B afetaram o potencial hídrico foliar e a taxa de crescimento das mudas de eucalipto reduzindo-as durante o período avaliado. Os genes estudados (BOR5, BORcl6871, PME3 e GTP8) aumentaram a sua expressão em plantas submetidas ao déficit hídrico quando aclimatadas com B ou suplementadas com o nutriente via foliar, exceto o gene BOR2. O GTP8 foi o gene com maior expressão relativa durante o estresse hídrico e quando realizada aplicação de B foliar. A aplicação de B em folhas maduras em plantas sob condições de reduzida disponibilidade de água se mostrou eficaz na mitigação dos efeitos negativos do estresse hídrico, induzindo o crescimento radicular e aumentando a tolerância á seca pelo genótipo de eucalipto.

## ABSTRACT

REIS, Bárbara Elias dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Expression of genes related to drought tolerance by eucalypt seedlings as affected by boron.** Adviser: Nairam Félix de Barros. Co-advisers: Ivo Ribeiro da Silva and Marcelo Ehlers Loureiro

Eucalypt plantations in Brazil have expanded towards regions with long dry periods and low fertility soils. During the dry season plants under water stress show young leaves with interveinal chlorosis and curled and branches tip die back induced by boron (B) deficiency. Symptom intensity varies among eucalypt genotype signaling to differential drought tolerance among genetic materials. Previous experiences have shown that supplying B just before water stress allows satisfactory plant growth and stimulate the expression of genes related to cell wall formation and B transport in the plants, particularly in roots of tolerant genotypes. This research aimed to evaluate B effect on differential transcription of genes related to cell wall synthesis and alterations (PME3 and GTP8) and B uptake and transport (BOR cl6871, BOR5, BOR2) in eucalypt clonal seedlings under water stress. Twenty-four plastic trays, containing 10 L of a complete nutrient solution, received four eucalypt seedlings each. Boron was supplied as  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) in the concentration of a  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . After thirty days in the nutrient solution the seedlings were split into two groups. In sixteen trays seedlings were grown in the nutrient solution, without B, and in eight they were grown with  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) in the solution for 25 days. Finished this period, increased doses of polyethyleneglycol (PEG) 6000 (100, 200, 250 e 360 g/L) were added every five days to raise gradually the nutrient solution tension to 0,15; 0,65; 1,00 e 1,5 MPa, according to the treatments. After PEG addition, B was removed from the nutrient solutions where it was still present. Therefore, four treatments were generated: a) plants under no-

water stress and no B in the nutrient solution (SS -B); b) plants under no- water stress and with B in the nutrient solution (SS +B); c) plants under water stress and no B in the nutrient solution (CS -B); d) plants under water stress and with B in the nutrient solution (CS +B). Two additional treatments consisted of plants under water stress and no B in the nutrient solution but: i) foliar  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) application to a mature leaf (CS BFM), and ii) foliar  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) application to a young leaf (CS BFJ).

Seedling biomass production and leaf water potential were negatively affected by water stress and no B application. Gene expression was augmented in plants submitted to water stress but supplied with B, except for BOR2. Boron application to mature leaves of seedlings under water stress mitigated the negative effects of the water stress by increasing root growth and drought tolerance.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a expansão dos eucaliptais tem ocorrido em regiões com baixa pluviosidade e solos com baixa capacidade de retenção de umidade e baixa fertilidade natural. No período de seca, como consequência do menor potencial hídrico do solo, a aquisição de boro (B) pelo sistema radicular é reduzida devido ao menor fluxo transpiracional (Mattiello et al., 2009a) e os principais sintomas normalmente observados são a seca dos ponteiros (Althoff et al., 1991), seguida do lançamento de brotação lateral, e, ou, dessecação de folhas. A intensidade desses sintomas e os distúrbios observados são genótipo dependentes, o que é indicativo de tolerância diferencial à seca.

Outros processos fisiológicos afetados pela deficiência de B são: síntese e estrutura da parede celular, lignificação, transporte de açúcares, respiração (Cakmak & Volker, 1997), diminuição da atividade da RUBISCO (Han et al., 2008), decréscimo da concentração de ácido ascórbico (Lukaszewski & Blevins, 1996), dentre outros. O acúmulo de compostos fenólicos nas folhas e raízes (Stavrianakou et al., 2006) em consequência da deficiência de B podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio promovendo danos na membranas celulares (Cakmak & Volker, 1997). Adicionalmente, há menor absorção de alguns nutrientes como potássio (Schon et al., 1990), potencializando os danos ocasionados pelo déficit hídrico, visto que este nutriente atua diretamente na regulação do controle osmótico das células vegetais (Taiz & Zeiger, 2009).

O conhecimento de todas as funções do B ainda é incipiente, principalmente sobre seu papel perante déficit hídrico. Sabe-se que em *Picea abies*, espécie lenhosa de clima temperado, plantas sem irrigação, mas com suprimento adequado de B mantiveram a mesma taxa de crescimento das plantas irrigadas (Möttönen et al., 2001). Em eucalipto, sob estresse hídrico, a presença de B melhorou a condutância estomática e a taxa transpiracional, além de aumentar a expressão de genes relacionados à síntese de parede e transportadores de B, especialmente em raízes, no clone tolerante, comparativamente ao clone sensível à seca (Nunes, 2010).

O requerimento de B está associado à quantidade de pectina na parede primária das células vegetais (Hu and Brown, 1994; Matoh et al., 1996), mas durante anos pesquisadores

questionaram-se sobre qual o papel específico do nutriente na parede. O'Neill et al. (2001) demonstraram participação deste por meio das ligações borato-diéster nas estruturas dos ramnagalacturonanos II (RG II). As ligações com B podem ocorrer entre os resíduos de apiose na cadeia dos RGII (O'Neill et al., 2004).

Devido à complexidade dos RG II pouco se conhece sobre a formação dos mesmos e em qual momento formam-se as ligações borato-diéster em sua estrutura (Miwa & Fujiwara, 2010). Com isso, alguns estudos têm focado em algumas enzimas, como as pectina-metilesterases (PME) e glicosiltransferases (GT) envolvidas diretamente na síntese e transformação de pectinas.

As PMEs estão diretamente envolvidas na construção do potencial eletrostático, extensão (Moustacas et al., 1991) e enrijecimento (Al-Qsous et al., 2004) da parede celular, alongamento do sistema radicular (Wen et al., 1999) e sua atividade se relaciona diretamente com a resposta ao estresse abiótico, como por exemplo, restrição hídrica (Pelloux et al., 2007) e também disponibilidade do B (Camacho-Cristóbal et al., 2008).

Vários são os tipos de GT nas plantas e essas participam de reações de transferência de açúcares para um vasto grupo de moléculas receptoras (Ross et al., 2001). As GT pertencentes à família 8 atuam no crescimento vegetal (Scheible et al., 2008) e a ausência deste gene resulta em menor crescimento, diminuta adesão entre as células foliares e radiculares facilitando sua desidratação (Bouton et al., 2002). Estes autores sugerem a importância dessa enzima na síntese de polissacarídeos pécnicos.

Em períodos de restrição hídrica o transporte e a absorção do B pelo sistema radicular de plantas de eucalipto se tornam limitados e os mecanismos relacionados a estes processos durante a seca bem como sua translocação para parte aérea são pouco elucidados.

Hu & Brown (1997) sugerem que a absorção depende de vários fatores, ocorrendo principalmente em resposta à concentração externa de B na solução do solo, taxa de transpiração e permeabilidade da bicamada lipídica. Plantas de eucalipto sob disponibilidade hídrica adequada apresentaram a taxa transpiracional e acúmulo de B 3,5 e 2 vezes superior, respectivamente, comparada às plantas submetidas à seca (Mattiello et al., 2009a). De acordo com estes autores, durante o período de déficit hídrico a difusão do B para as raízes se mostrou importante para o suprimento do nutriente às plantas.

Há controvérsias sobre qual mecanismo de absorção e transporte de B seja predominante. Acreditava-se que a absorção e transporte deste nutriente ocorressem apenas por processo passivo, tendo em vista a alta solubilidade do ácido bórico, o que facilitaria sua passagem através da bicamada lipídica (Raven, 1980, Brown & Hu, 1994). Este processo pode prevalecer quando há alta disponibilidade de B na solução do solo. Todavia, em condições limitantes do nutriente, como, por exemplo, durante o déficit hídrico, transportadores de B, energeticamente dependentes, podem atuar facilitando a entrada do nutriente através das raízes (Stangoulis et al., 2001; Takano et al., 2002; Tanaka et al., 2008).

Poucos transportadores de B são conhecidos. Miwa & Fujiwara (2010) sugeriram que a ação conjunta de transportadores do tipo NIP 5:1, um canal de ácido bórico, (Kato et al., 2008; Tamaka & Fujiwara, 2008) e BOR1, um transportador de efluxo envolvido no carregamento de B para o xilema (Takano et al., 2002; Takano et al., 2005), facilitariam a aquisição e direcionamento de B para parte aérea, principalmente diante de baixa disponibilidade do elemento na solução do solo.

Em campo, durante o período de seca, a aplicação foliar de B se mostra como prática eficiente para diminuição dos sintomas ocasionados por sua deficiência e retomada do crescimento em plantios de eucalipto (Barros, NF; comunicação pessoal). E ainda que o B seja considerado um nutriente com baixa mobilidade na planta (Oertli & Richardson, 1970; Raven, 1980) devido à sua função estrutural (O'Neill et al., 2004), alguns materiais genéticos possuem mecanismos de translocação do nutriente, como observado em *Prunus amygdalus*, *Malus domestica* (Brown & Hu, 1996), *Sorbus aucuparia*, *Prunus padus*, *Alnus incana*, *Fraxinus excelsior*, *Betula pubescens* (Lehto et al., 2004) e híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (Mattiello et al., 2009b).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição do B na transcrição diferencial de genes relacionados à síntese de parede celular, absorção e transporte do B, durante o período de déficit hídrico no genótipo de eucalipto tolerante à seca.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Crescimento das plantas e tratamento com déficit hídrico

Mudas de um clone de *Eucalyptus urophylla* caracterizado como tolerante à seca por Nunes et al. (2010), produzidas por mini estaquia, foram aclimatadas em solução nutritiva de Clark (Clark 1975) com pH 5,5 e disponibilidade de  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) igual a  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em 24 bandejas com 10 L de solução sob constante aeração. Cinco plantas do clone foram cultivadas em cada bandeja e a cada dois dias procedeu-se a correção do pH, elevando-o a aproximadamente 5,8.

Após 30 dias em condições de casa de vegetação separaram-se as plantas em dois grupos. Dezesesseis bandejas foram mantidas em solução de Clark e sem B na solução e oito bandejas foram transferidas para solução com  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $^{11}\text{B}$  (99 atom %) durante 25 dias. Após este período, doses crescentes de polietilenoglicol (PEG) 6000 (0, 100, 200, 250 e 360 g/L) foram adicionadas a cada cinco dias para reduzir gradativamente o potencial hídrico da solução à -0,05; -0,15; -0,65; -1,00 e -1,5MPa, respectivamente, nos devidos tratamentos (Michel & Kaufmann, 1973). Após a aplicação da primeira dose de PEG foi retirado o B nos tratamentos onde este ainda se encontrava presente na solução (Figura 1).

Assim, os tratamentos constituíram de: a) plantas sem déficit hídrico (potencial hídrico igual a -0,05 MPa) e suprimento interno inadequado de B, b) plantas sem déficit hídrico (potencial hídrico igual a -0,05 MPa) e com suprimento interno adequado de B, c) plantas com déficit hídrico e suprimento interno inadequado de B, d) plantas com déficit hídrico e com suprimento interno adequado de B. Dois tratamentos adicionais foram utilizados: o primeiro com déficit hídrico, suprimento interno inadequado de B e aplicação foliar de  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) em folha madura e o segundo semelhante ao primeiro, mas com a aplicação de  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) à folha jovem (Figura 1).

Foi considerado tempo zero o momento da adição da primeira dose de PEG e aplicação foliar de B nos devidos tratamentos. A aplicação foliar foi realizada imergindo-se uma folha madura ou jovem, de acordo com o tratamento, em solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  enriquecida com  $^{10}\text{B}$  (99 atom %) na concentração de  $1,64 \text{ g L}^{-1}$   $^{10}\text{B}$  durante um minuto.

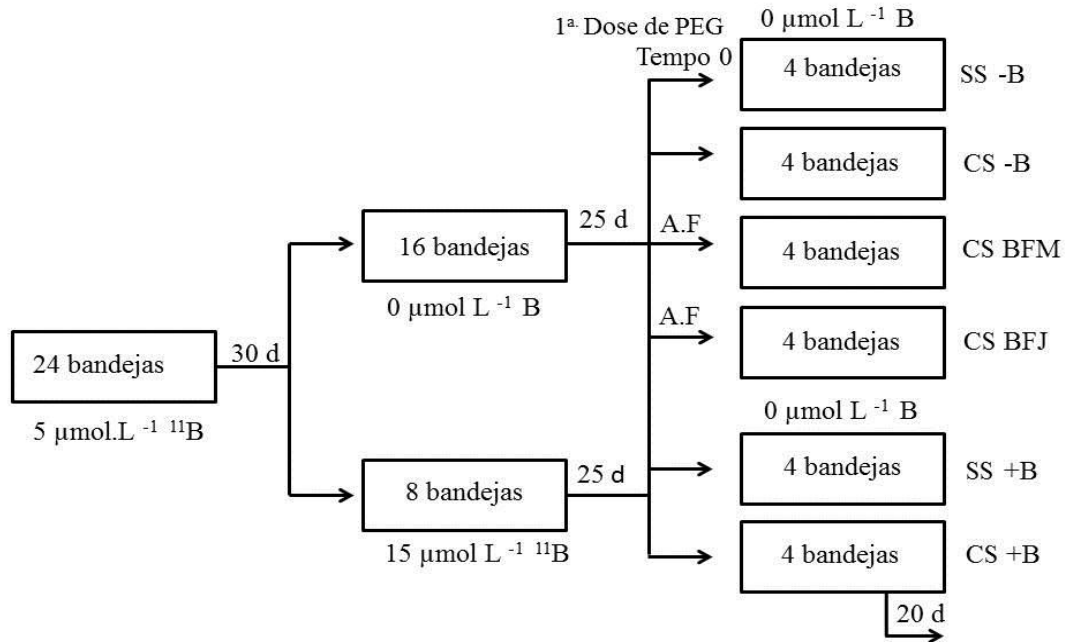


Figura 1: Esquema sobre a aclimação e aplicação dos tratamentos. A.F, aplicação via foliar de B. SS -B, adequada disponibilidade hídrica e aclimação na ausência de B; SS +B, adequada disponibilidade hídrica e aclimação na presença de B; CS -B, restrição hídrica e aclimação na ausência de B; CS +B, restrição hídrica e aclimação na presença de B; CS BFM, restrição hídrica e aplicação de B à folha madura; CS BFJ, restrição hídrica e aplicação de B à folha jovem.

A primeira coleta de amostras e avaliação do potencial hídrico foliar foi realizada um dia após a aplicação da primeira dose de PEG, a segunda, cinco dias após a aplicação desta e as coletas subsequentes foram realizadas cinco dias após a aplicação das doses posteriores de PEG. Obtendo-se as coletas 1, 5, 10, 15 e 20 dias após a aplicação dos tratamentos.

Foram coletadas amostras de folhas e raízes novas que foram imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80 °C para posterior extração do RNA. Em seguida, coletaram-se amostras de folhas jovens, maduras e raízes finas que foram secas em estufa com circulação de ar a 65 °C por 72h, maceradas para determinação dos teores totais de B, após digestão em mufla a 550 °C, pelo método espectroscópico da azometina H<sup>+</sup> a 410 nm (Wolf, 1974). O restante do material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar a 65 °C por 72h e determinou-se a matéria seca da parte aérea, do sistema radicular e total.

Realizou-se a determinação do potencial hídrico foliar no momento de cada coleta, no período da antemã, utilizando bomba de pressão do tipo Scholander.



## 2.2 Expressão Gênica

### 2.2.1 Extração de RNA

Amostras de folhas e raízes foram coletadas das repetições, combinadas e maceradas em N<sub>2</sub> líquido, compondo-se, assim, uma amostra composta por tratamento. Um grama de cada amostra foi coletado em três tubos de microcentrífuga de 2,0 mL de capacidade. Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de tampão de extração, composto por 2 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, 25 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 200 mmol L<sup>-1</sup> de Tris (pH 8,0), 20 mmol L<sup>-1</sup> de borato de sódio, 2 % de PVPP (p/v), 2 % de CTAB (p/v), 1 % de LSS (p/v), e 2 % de β-mercaptoetanol (v/v). A amostra foi homogeneizada com o tampão e incubada a 65 °C por 10 min. Depois da incubação o material foi centrifugado a 15.000 g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo contendo 1 mL de fenol saturado/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v/v, pH 4,5). Em seguida, cada amostra foi centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O passo anterior foi repetido até que o sobrenadante se tornasse totalmente limpo. Então, este foi coletado em novo tubo e centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante coletado e transferido para um tubo de microcentrífuga foi homogeneizado com 100 µL de NaCl 5 mol L<sup>-1</sup> e, finalmente, adicionou-se um volume de 1 mL 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 pellet enxaguado com etanol 75 %, e seco à temperatura ambiente. Depois, o pellet foi ressuscitado em 50 µL de água tratada com DEPC e armazenado a -80 °C até o momento do uso (Wang et al.,2007 adaptado).

O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro, com base na absorbância A<sub>260nm</sub> e A<sub>280nm</sub>, e sua concentração ajustada para 300 ng µL<sup>-1</sup>. Sua integridade física foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Wilson e Walker, 2000).

### 2.2.2 Síntese de cDNA

Cada amostra de RNA foi analisada em triplicatas e 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 10X, completando com água estéril tratada com DEPC para o volume

final de 10 µL. Depois, procedeu-se à incubação a 37 °C por 45 minutos. A inativação da DNase ocorreu mediante a adição de solução de parada (*RQ1 DNase Stop Solution: Promega*) e incubação a 65 °C por 10 minutos.

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 10 µL do produto do tratamento com *DNase I*; 500 ng de oligo-dT(18) e 1 µL de dNTPs (10 mmol 39 L<sup>-1</sup> cada), incubando a 65 °C por 10 min e, depois 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 MgCl<sub>2</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup>, 2 µL de ditiotreitol 100 mmol L<sup>-1</sup>, 1 µL de RNaseOUT inibitor (*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, as amostras foram colocadas 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*.

### 2.2.3 Análise da expressão via PCR em Tempo Real

As sequências relacionadas aos genes de estudos foram obtidas no NCBI ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) (Quadro 1). Os *Primers* foram obtidos pelo programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para um tamanho aproximado de 19 a 21 bases, T<sub>m</sub> (*melting temperature*) entre 54 e 60 °C produzindo amplicons entre 80 e 200 pares de base. Os *primers* que foram utilizados estão descritos no Quadro 1.

A validação dos *primers* foi realizada pela curva padrão relativa utilizando amostra do cDNA sintetizado diluída em volume original do cDNA, cinco, 25 e 125 vezes, com três repetições para cada diluição. A especificidade das reações de amplificação foi determinada pela T<sub>m</sub> dos produtos da reação de amplificação. Foram considerados válidos os *primers* de equação linear com R<sup>2</sup> >98 %, coeficiente de variação <10 %, eficiência de amplificação entre 90 e 100 % e *Sloop* de aproximadamente -3, conforme sugerido pelo fabricante (*Applied Biosystems*, Foster City, US).

A análise de expressão relativa foi realizada em equipamento Step-One Plus (*Applied Biosystems*,US), utilizando três conjuntos de amostras gerados e cada reação foi

analisada em triplicatas. A análise de dados foi feita utilizando o software *Step-One Plus* versão 2.0 (*Applied Biosystems*, Foster City, US). Os valores do Ct (*threshold cycle*) das réplicas foram calculados pelo método de quantificação relativa dos níveis de cópia de amplificação (Ali-Benali et al., 2005).

De acordo com o protocolo de reação do Real Time, cada reação foi composta de 0,2  $\mu\text{mol}^{-1}$  de cada *primer* (senso e antisenso), 0,1 $\mu\text{L}$  de dNTPs 5  $\text{mmol L}^{-1}$ , 2  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10X, 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 2  $\mu\text{L}$  de SYBR green (100X), 0,4  $\mu\text{L}$  de ROX, 0,05  $\mu\text{L}$  de Platinum Taq DNA pol 5U/ $\mu\text{L}$  (*Invitrogen*), 0,4  $\mu\text{L}$  de cDNA e completando o volume para 20  $\mu\text{L}$  com água. O programa de PCR foi de 90 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 58 °C por 1 min. A curva de dissociação foi determinada pelas temperaturas de 60 °C elevando em 0,2 °C a cada 20 s até atingir 95 °C

Foram avaliados os materiais vegetais das coletas referentes ao 1º, 10º e 20º dia, e na análise dos dados, considerou-se no primeiro tempo, as plantas bem supridas com B e ausência de déficit hídrico como controle comparativo da expressão relativa do gene nos outros tratamentos e tempos.

Para normalizar a expressão relativa dos genes selecionados foi utilizado *primer* para o gene constitutivo RPtnL23A (proteína ribossomal) por apresentar menor baixo desvio padrão entre os tratamentos (Vandesompele et al. (2002).

Quadro 1 - Primers utilizados para o PCR em Tempo Real

GenBank <sup>1</sup>		Sequência do primer	
		Senso 5'-3'	Anti-senso 5'-3'
<b>Primers dos genes constitutivos</b>			
RPtnL23A	db 28432294	AAGGACCCTGAAGAAGGACA	CCTCAATCTTCTTCATCGCA
H2B	AY263810	GAGCGTGGAGACGTACAAGA	GGCGAGTTTCTCGAAGATGT
<b>Primers dos genes relacionados ao transporte de B</b>			
BOR cl6871*		TCAATGCCCGGTTGACGAA	CGACACACCCTCCCACCATC
BOR2	AY070067.1	CGACCACGCGTCCGAGAATC	ACGACAGCGAGTCCACCCTC
BOR5	XM_002304128	TGGTTGGTTCGCTTTGTGCGCC	CCACGGGAAGAGGCTGGAG
<b>Primers dos genes relacionados à síntese de parede celular</b>			
GTP8	DQ645941.1	ACACATGGTTTGGCCCCGTG	GACAGTCGATGGCCTTGCGC
PME3	DQ376133.1	GAACCGCAAGGACCCGAACC	GGAAGCTCCCGTTTGAGGCG

<sup>1</sup>, Número de acesso do gene no banco de dados NCBI. \* Sequência extraída do banco de genes *Genolyptus*- banco não divulgado.

### **2.3 Análises estatísticas**

Os resultados de potencial hídrico foliar, teores de B, matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes e matéria seca total foram submetidos à análise de variância e regressão utilizando-se o software STATISTICA 8.0. Todas as variáveis foram ajustadas em função do tempo.

Com base no coeficiente de determinação, significância da regressão, testados pelo teste F e pela significância dos coeficientes da regressão, testados pelo teste “t”, foram escolhidos os modelos que melhor explicaram o comportamento das variáveis.

As diferenças entre os tratamentos foram obtidas através das integrais das funções ajustadas utilizando o software CURVEEXPERT 1.3.

O padrão de co-expressão dos genes foi analisado por correlação de *Spearman*, visando detectar a atividade gênica similar em resposta à disponibilidade hídrica e suplementação com B, utilizando o STATISTICA 8.0.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Potencial hídrico foliar

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ) reduziu significativamente com aumento da restrição hídrica aplicada à solução ( $|\Psi_w|$ ) em todos os tratamentos avaliados. Em razão das medições serem realizadas na antemanhã, o  $\Psi_{wf}$  tendeu a se equilibrar com a  $|\Psi_w|$ , entretanto sua função diferiu com o tratamento aplicado, com tecidos mais hidratados nas plantas que receberam B durante a fase de restrição hídrica (Figura 2).

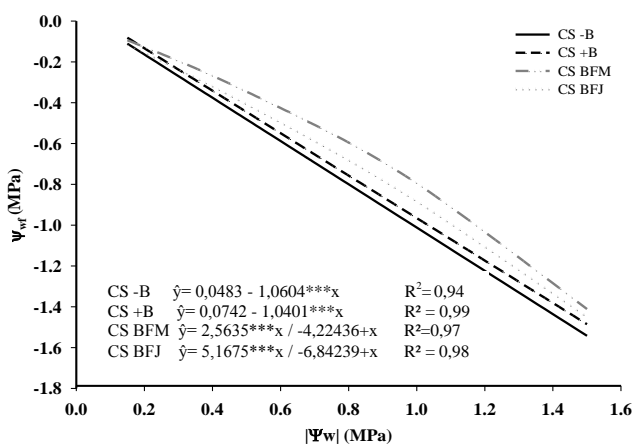


Figura 2: Potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ) em mudas de eucalipto em resposta ao potencial hídrico da solução ( $|\Psi_w|$ ), na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B durante aclimação e aplicação deste em folha madura (CS BFM) ou jovem (CS BFJ). \*\*\*, significativo à 1 % de probabilidade, de acordo com o teste t.

Entre os potenciais hídricos de -0,65 e -1,00 MPa, as plantas que receberam aplicação de B em folha madura ou em folha jovem se mantiveram mais hidratadas comparadas aos demais tratamentos. Cabe ressaltar que durante o déficit hídrico o suprimento de B via solução foi cessado, efetuando-se aplicação via foliar nos tratamentos CSBFM e CSBFJ. Após -1,00 MPa houve pequena diferença entre os tratamentos.

#### 3.2 Teores de B e matéria seca

Os teores de B nas folhas maduras, folhas jovens e raízes foram influenciados significativamente pela disponibilidade de B e presença de déficit hídrico. As plantas com boa disponibilidade hídrica e suprimento de B durante toda aclimação possuíram aproximadamente, no intervalo de 1 a 20 dias, incremento de 13,29 e 7,96 mg kg<sup>-1</sup> d

(Quadro 2) nos teores de B em folhas maduras e jovens, respectivamente, comparadas com plantas crescidas na ausência do nutriente (Figura 3 e 4).

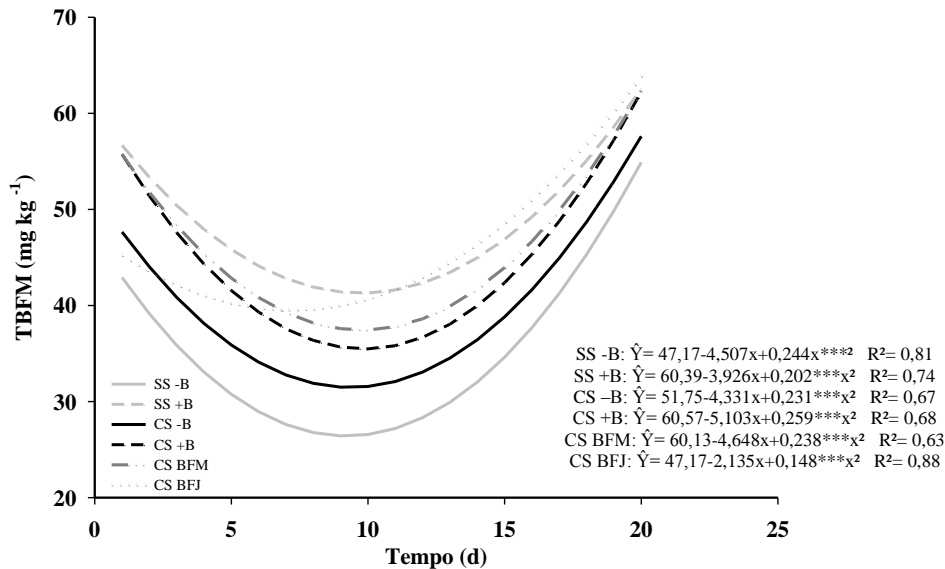


Figura 3: Teores de B em folhas maduras (TBFM) em mudas de eucalipto nos tratamentos com adequada disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*\*\*, significativo 1 % de probabilidade de acordo com o teste t.

Sob restrição hídrica, cinco dias após aplicação via foliar de B, foi observado incremento de 20,47 e 13,97 mg kg<sup>-1</sup> d no teor de B em folhas jovens nos tratamentos CSBFM e CSBFJ, respectivamente, comparadas aos teores de B em folhas jovens de plantas crescidas sem suprimento de B (Figura 4 e Quadro 2). Após este período, os teores de B em folhas jovens nestes tratamentos decresceram com a redução do potencial hídrico da solução (Figura 4), no entanto, para o tratamento CSBFM foi observado aumento de 12,52 mg kg<sup>-1</sup> d no teor de B nas raízes, entre 15 e 20 dias, comparado ao tratamento CSBFJ (Figura 5 e Quadro 2).

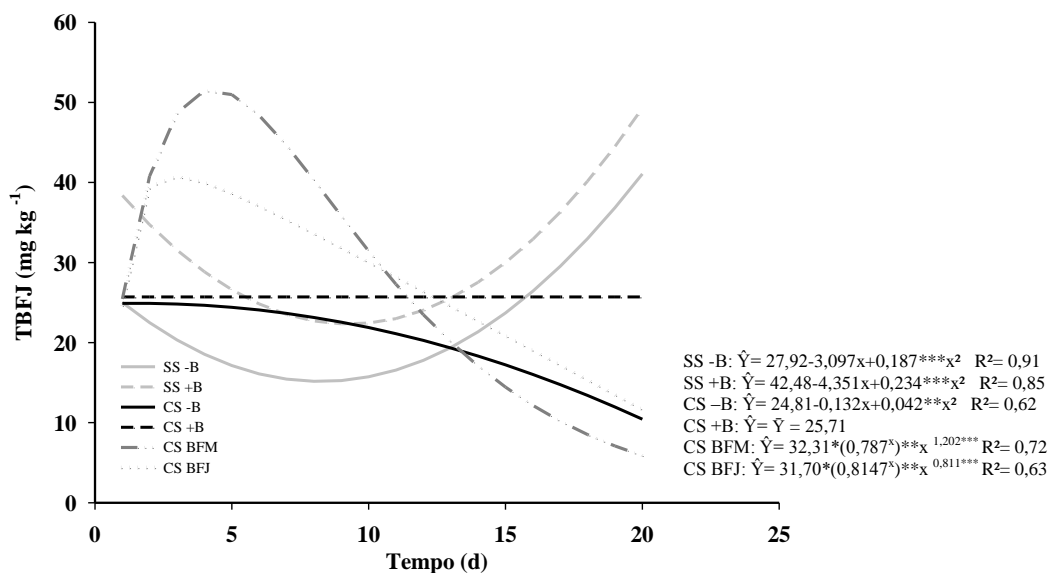


Figura 4: Teores de B em folhas jovens (TBFJ) em mudas de eucalipto nos tratamentos com adequada disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*\*,\*\*\*, significativo à 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

Após 15 dias, ocorreu decréscimo no teor de B nas raízes no tratamento CSBFM e aumento mais acentuado ao longo do tempo nos tratamentos CS -B e CSBFJ, evidenciando nestes últimos casos um efeito de concentração, tendo em vista o menor crescimento da matéria seca radicular e no primeiro caso uma possível diluição devido ao crescimento exponencial, como será demonstrado posteriormente (Figura 5).

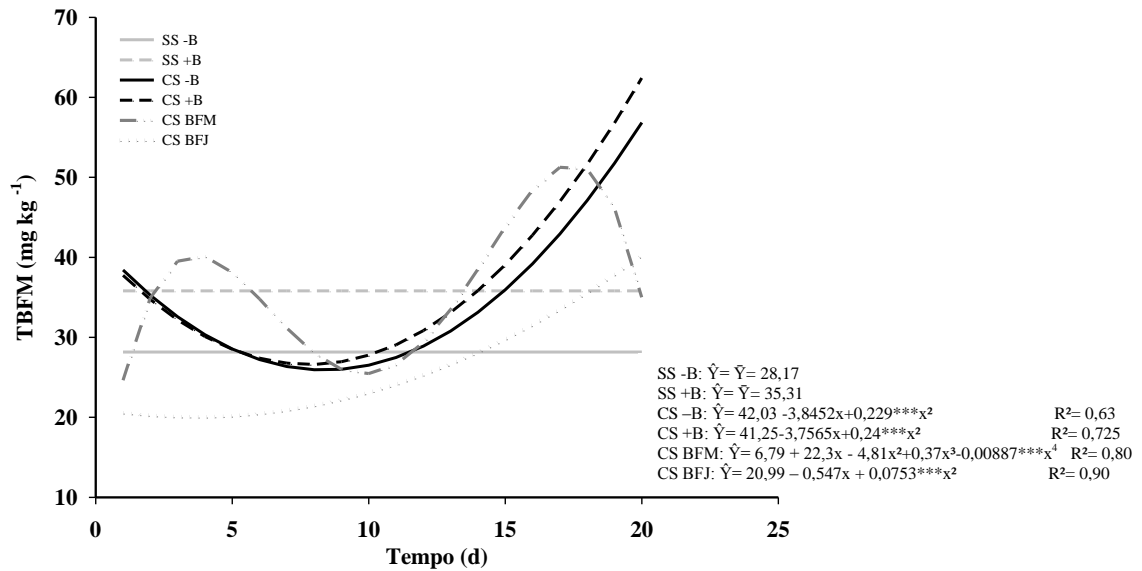


Figura 5: Teores de B em raízes (TBR) em mudas de eucalipto nos tratamentos com adequada disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*\*\*, significativo 1 % de probabilidade de acordo com o teste t.



Quadro 2: Integrais obtidas através das funções ajustadas para o potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ) e teores de B das folhas maduras (TBFM), jovens (TBFJ) e raízes (TBR) em mudas de eucalipto nos tratamentos com adequada disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias.

Intervalos	Integral (MPa MPa)					
	$\Psi_{wf}$ (MPa)					
	Tratamentos					
$ \Psi_{wf} $ (MPa)	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFV	CS BFJ
0.15 a 0.2			0.2428	0.1392	0.2493	0.3064
0.2 a 0.4			0.2697	0.2378	0.1966	0.2374
0.4 a 1.0			0.6939	0.6539	0.5166	0.5935
1.0 a 1.5			1.2771	1.2260	1.0860	1.1593
0.015 a 1.5			0.8970	0.7851	0.6702	0.7396
	Integral (mg kg <sup>-1</sup> d)					
	TBFM ((mg kg <sup>-1</sup> ))					
Tempo (d)						
1 a 5	36.18	50.70	41.15	47.94	48.64	42.30
5 a 10	27.64	42.71	32.76	37.43	39.14	39.82
10 a 15	29.57	43.25	34.22	37.84	39.70	43.99
15 a 20	43.73	53.87	47.24	51.22	52.15	55.59
1 a 20	34.18	47.47	38.72	43.38	44.71	45.59
	TBFJ (mg kg <sup>-1</sup> )					
Tempo (d)						
1 a 5	20.57	31.86	24.77	25.71	45.24	38.74
5 a 10	15.64	23.53	23.32	25.71	42.11	34.41
10 a 15	18.93	25.23	19.72	25.71	22.15	25.43
15 a 20	31.60	38.65	14.00	25.71	9.59	16.22
1 a 20	21.75	29.71	20.22	25.71	28.96	28.17
	TBR (mg kg <sup>-1</sup> )					
Tempo (d)						
1 a 5	28.17	35.31	33	32.47	36.82	20.13
5 a 10	28.17	35.31	26.57	27.12	30.27	21.29
10 a 15	28.17	35.31	30.27	32.41	32.32	26.09
15 a 20	28.17	35.31	45.44	49.74	47.18	34.66
1 a 20	28.17	35.31	33.83	35.59	36.65	25.83

O incremento da matéria seca das mudas foi significativamente reduzido pela restrição hídrica e ausência de B na solução (Figura 6). A redução na produção de matéria seca total das mudas pela imposição do estresse hídrico, no intervalo de 1 a 20 dias, foi de 6,89 g dia/planta (Quadro 3).

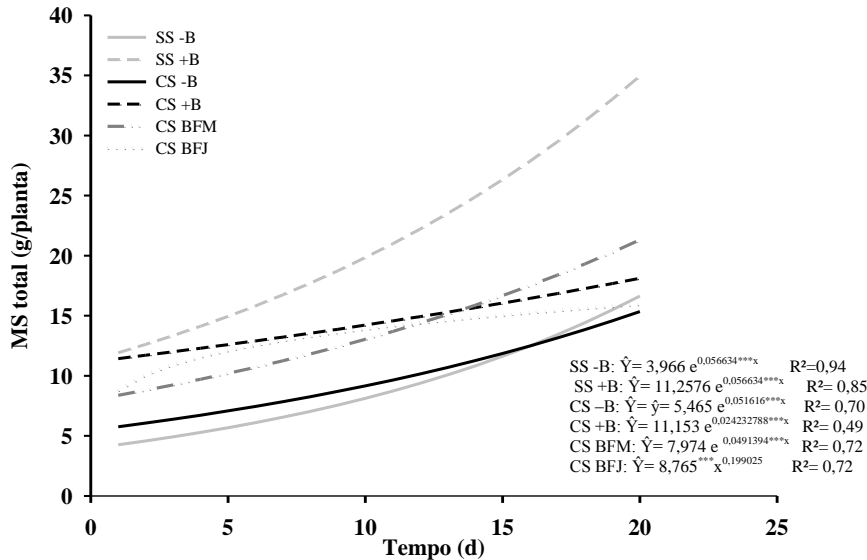


Figura 6: Matéria seca total (MS total) nos tratamentos com adequada disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*\*\*, significativo à 1 % de probabilidade pelo teste t.

A omissão de B, em condições hídricas adequadas, levou à redução de 9,68 g dia/planta da parte aérea (MSPA) (Figura 7 e Quadro 3) no intervalo de 1 a 20 dias. A matéria seca do sistema radicular (MSR) aumentou em 2,63 g dia/planta com o suprimento do nutriente. A ausência de B limitou severamente a produção de raízes (Figura 8).

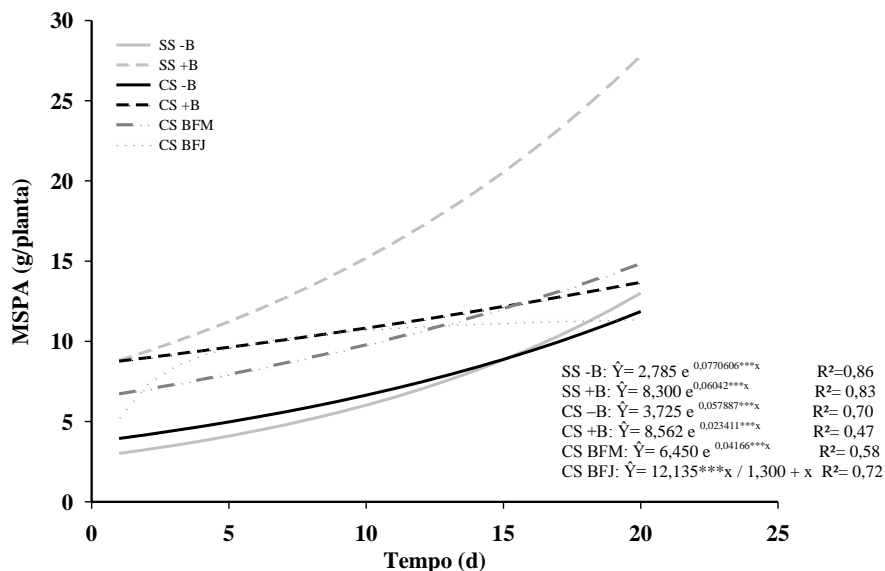


Figura 7: Matéria seca da parte aérea (MSPA) nos tratamentos com disponibilidade hídrica adequada e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*\*\*, significativo à 1 % de probabilidade pelo teste t.

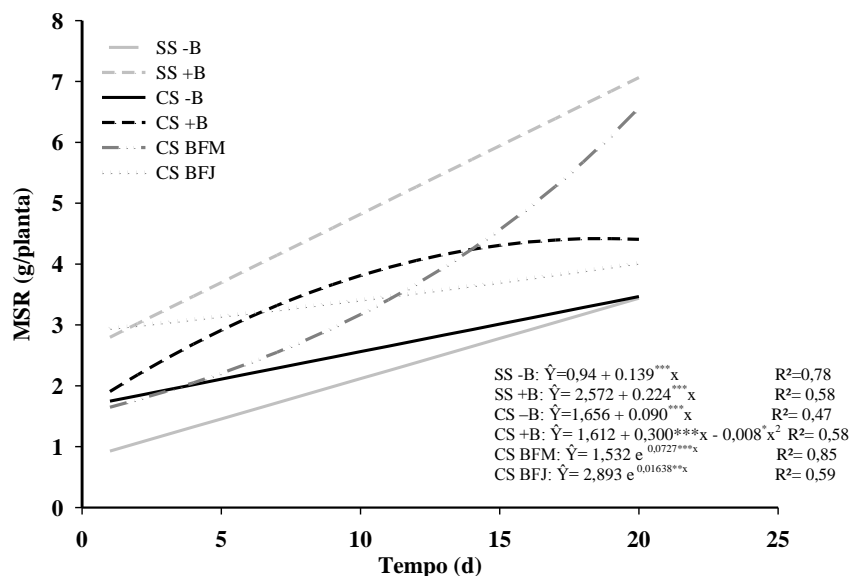


Figura 8: Matéria seca do sistema radicular (MSR) nos tratamentos com boa disponibilidade hídrica e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ), durante 20 dias. \*, \*\*, \*\*\*, significativo à 15, 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

A aplicação de B via folha madura ou jovem, durante o período de restrição hídrica, permitiu a recuperação da produção de matéria seca, especialmente quando feita via folha madura. (Figuras 6 e 8). A aplicação de B à folha jovem permitiu recuperação inicial de 4,4 g dia/planta, entre 5 a 10 dias, da matéria seca da parte aérea em comparação às plantas sem o nutriente (Figura 7 e Quadro 3), enquanto que a aplicação via folha madura levou a recuperação mais intensa da matéria seca com o passar do tempo, em particular do sistema radicular, chegando quase a se igualar às plantas com suprimento normal de B e sem estresse hídrico ao final de 20 dias. O incremento da matéria seca do sistema radicular, no tratamento CSBFM após 20 dias de déficit hídrico, foi aproximadamente duas vezes superior às plantas sob déficit e aclimatadas na ausência de B (Figura 8).

Durante o período de avaliação o incremento da aplicação de B à folha madura sob condição de déficit hídrico em comparação às plantas aclimatadas na ausência de B foi de 3,06, 0,95 e 4,06 g dia/planta para matéria seca da parte aérea, radicular e total, respectivamente (Quadro 3).

Quadro 3: Integrais obtidas através das funções ajustadas matéria seca total (MS total), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca do sistema radicular (MSR) em relação ao tempo (1 a 20 dias) (d) nos tratamentos com disponibilidade hídrica adequada e aclimatados na ausência (SS -B) ou presença (SS +B) de B e nos tratamentos submetidos à restrição hídrica aclimatados na ausência (CS -B) ou presença (CS +B) de B e aplicação deste em folhas maduras (CS BFM) ou jovens (CS BFJ)

Intervalos	Integral (g dia/planta)					
	MS total (g/planta)					
Tempo (d)	Tratamentos					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1 a 5	4,93	13,37	6,39	11,99	9,25	10,76
5 a 10	6,82	17,27	8,072	13,38	11,55	13,05
10 a 15	9,77	22,93	10,45	15,11	14,77	14,47
15 a 20	13,98	30,43	13,52	17,05	18,89	15,48
1 a 20	9,085	21,40	9,78	14,51	13,85	13,58
	MSPA (g/planta)					
1 a 5	3,52	9,97	4,44	9,19	7,32	8,16
5 a 10	4,99	13,11	5,77	10,21	8,83	10,29
10 a 15	7,34	17,73	7,71	11,48	10,88	10,98
15 a 20	10,79	23,98	10,29	12,90	13,39	11,29
1 a 20	6,83	16,53	7,19	11,04	10,25	10,29
	MSR (g/planta)					
1 a 5	1,32	3,25	1,93	2,43	1,91	3,04
5 a 10	1,90	4,26	2,33	3,39	2,66	3,27
10 a 15	2,55	5,38	2,78	4,09	3,82	3,55
15 a 20	3,21	6,51	3,24	4,39	5,50	3,85
1 a 20	2,29	4,93	2,61	3,64	3,56	3,45

### **3.3 Expressão relativa de genes relacionados ao transporte de B e síntese de parede celular**

De maneira geral, a expressão relativa dos genes estudados, especialmente nas raízes, aumentou em resposta ao déficit hídrico e à disponibilidade de B, exceto para o BOR2 (Figuras 9 e 10).

Os genes relacionados com canal de efluxo desse nutriente, BOR cl6871 e BOR5, apresentaram comportamento semelhante diante dos tratamentos impostos tanto em folhas como nos tecidos radiculares. Em condições de adequada disponibilidade hídrica e suprimento interno inadequado de B houve menor expressão destes genes nos tecidos foliares e radiculares, mais pronunciadamente para o BOR CL nas folhas e, aproximadamente, em 50 % em raízes para ambos os genes (Figuras 9A, 9B, 9C e 9D).

Com a progressão do déficit hídrico o gene BOR cl6871 teve expressão relativa nas folhas mais pronunciada em plantas bem supridas com B (Figura 9A). A partir do potencial hídrico de -0,65 MPa, a expressão foi mais marcante nas plantas para as quais houve aplicação foliar de B, chegando a aumentos de, aproximadamente, quatro vezes quando a aplicação foi realizada em folha madura. No sistema radicular, o aumento da expressão relativa deste gene, com aplicação foliar de B, também ocorreu a partir do potencial hídrico de -0,65 MPa (Figura 9B).

De forma semelhante ao BOR cl6871, a expressão relativa do BOR5 nas folhas, durante o déficit hídrico, foi altamente influenciada pela aplicação de B em folha madura (Figuras 9C e 9D). Nos potenciais hídricos de -0,15 e -0,65 MPa o aumento na expressão relativa desse gene com a aplicação de B em folha madura, foi de 3,5 vezes, aproximadamente. No sistema radicular a expressão do gene pouco diferiu entre plantas com suprimento de B ou aplicação via foliar. No potencial hídrico de -1,5 MPa, ocorreu queda da expressão dos dois transportadores, tanto na parte aérea como radicular.

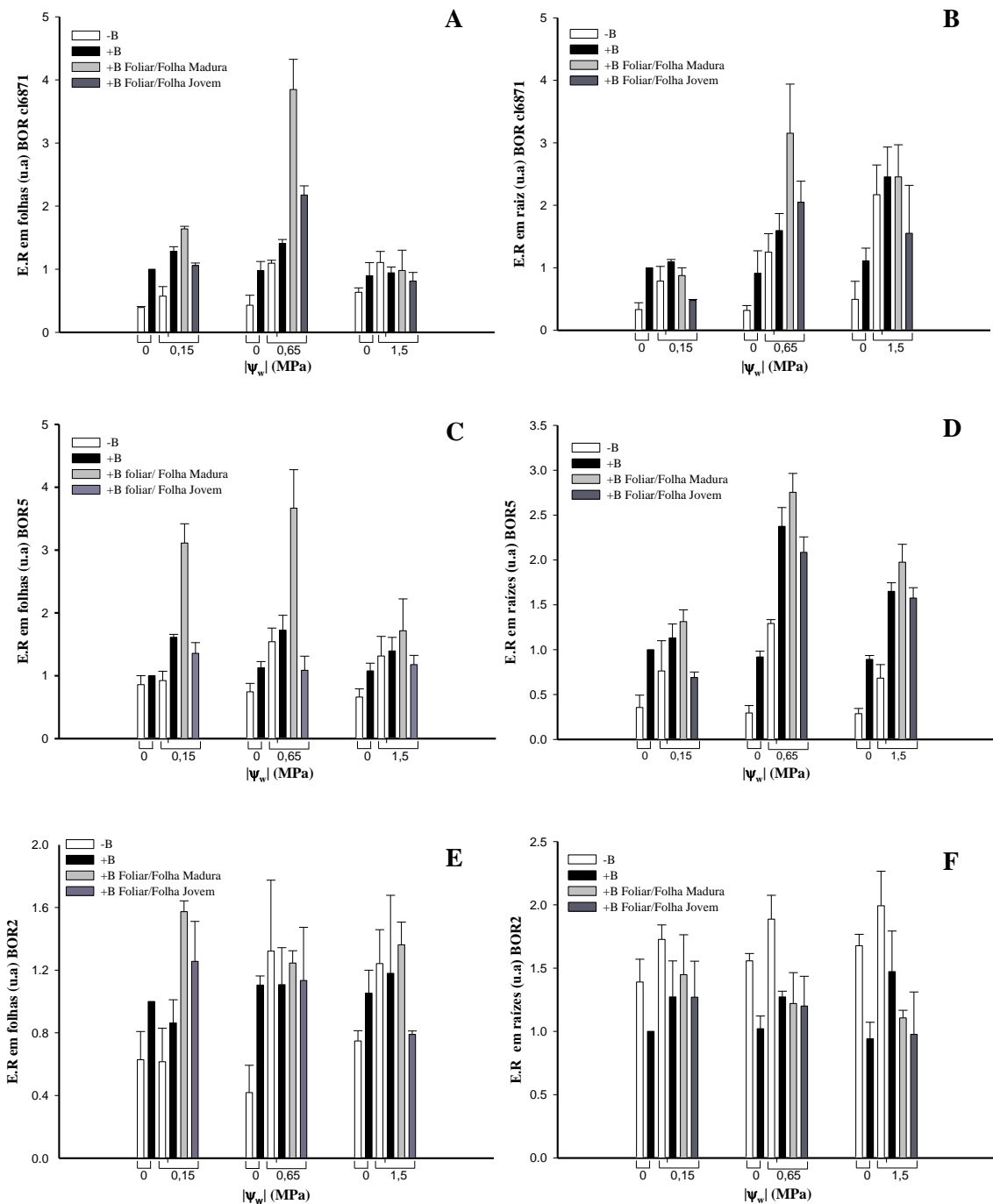


Figura 9: Expressão relativa de genes (E.R) transportadores de B (BOR cl6871, BOR5 e BOR2) em folhas (A, C e E, respectivamente) e raízes (B, D, F respectivamente) de mudas de eucalipto submetidas à soluções nutritivas sob diferentes potenciais hídricos ( $|\Psi_w|$ ) nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folha madura ou jovem.

Diferentemente dos transportadores BOR cl6871 e BOR5, o BOR2 possui efeito contrário diante da disponibilidade B e presença do déficit hídrico (Figuras 9E e 9F). A

ausência do nutriente resultou em aumento na expressão relativa do BOR2 em raízes, sendo esta resposta mais pronunciada do que a presença da restrição hídrica. Por outro lado a aclimação das plantas na presença de B acarretou menor expressão relativa desse transportador. (Figura 9F).

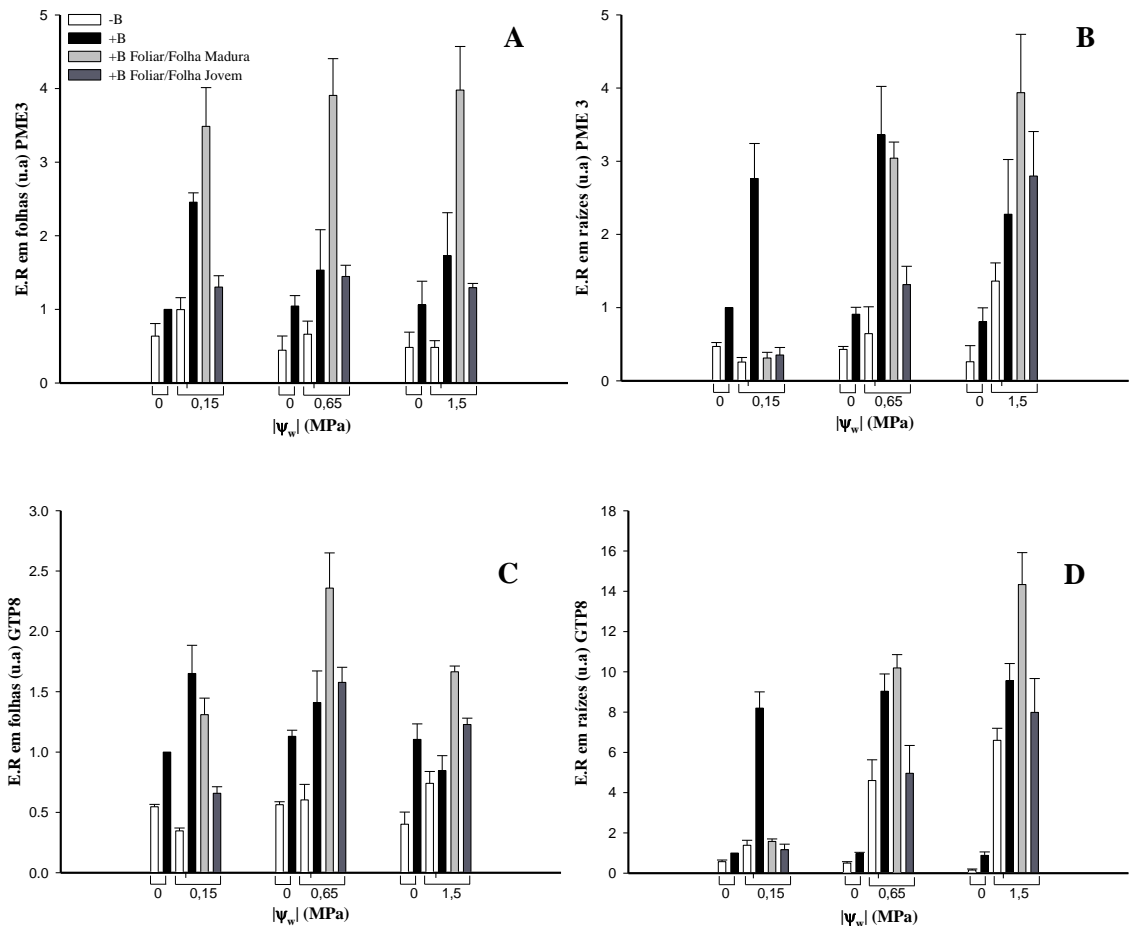


Figura 10: Expressão relativa de genes (E.R) relacionados á formação de parede celular, pectina metilesterase (PME3) e glicosil-transferase isoforma 8 (GTP8), em folhas (A e C, respectivamente) e raízes (B e D, respectivamente) de mudas de eucalipto submetidas à soluções nutritivas sob diferentes potenciais hídricos ( $\Psi_w$ ) nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folhas madura ou jovem.

Os genes relacionados com a síntese de parede celular, PME3 (pectina metilesterase) e GTP8 (glicosiltransferase), tiveram sua expressão reduzida em aproximadamente 50 % nas plantas cultivadas na ausência de B e disponibilidade hídrica adequada. Com a progressão da restrição hídrica ocorreu aumento da expressão relativa



desses genes tanto em folha como em raízes e a presença de B incrementou a expressão (Figura 10).

Em folhas e raízes, a expressão relativa da PME3 foi favorecida pela aplicação foliar de B, principalmente quando realizada em folha madura. Nas raízes o maior valor encontrado de expressão gênica, pela aplicação de B à folha madura, ocorreu quando o potencial hídrico -1,5 MPa (Figuras 10A e 10B). Ressalta-se que quando o potencial hídrico da solução foi reduzido a este valor se passavam 15 dias da aplicação foliar do nutriente. A resposta do gene em folhas, induzida pela aplicação foliar de B, ocorreu em um período de tempo inferior ao sistema radicular.

A resposta da GTP8 se assemelhou à PME3, entretanto sua expressão relativa foi mais pronunciada, com aumento de 14 vezes, aproximadamente, no potencial hídrico de -1,5 MPa, em raízes para o tratamento com aplicação de B na folha madura (Figuras 10C e 10D).

### **3.4 Co-expressão dos genes em resposta ao déficit hídrico e disponibilidade de B**

A correlação entre a expressão dos genes estudados em folhas e raízes não foi significativa. Entretanto, quando a co-expressão foi avaliada em cada tecido específico observou-se alta correlação (acima de 0,80) entre os genes estudados, dependendo do tratamento (Quadros 5 a 8).

Nas folhas, houve baixa correlação entre a expressão dos genes estudados. Os genes relacionados ao transporte de B e síntese de parede apresentaram alta correlação (co-expressão acima de 90 %) apenas quando havia boa disponibilidade hídrica e presença de B (Quadro 5). Quando submetidas à restrição hídrica, a co-expressão dos genes foi desprezível, indicando menor previsibilidade destes quando submetidos à seca (Quadro 8).

Diferentemente, nas raízes a co-expressão dos genes ocorreu diante do déficit hídrico, indicando que ocorreu indução genética em tecido específico diante da baixa disponibilidade hídrica (Quadro 8). O GTP8 foi o gene com maior expressão desse estresse. Em plantas bem supridas com B, o BOR cl6871 apresentaram co-expressão (95%) com GTP8, mas teve baixa correlação com a PME3. Entretanto, quando ocorreu aplicação de B nas folhas maduras, o BOR cl6871 apresentou maior interação com ambos os genes de síntese de parede, 80 e 85 % de co-expressão, respectivamente (Quadro 8)

Na presença de déficit hídrico e ausência de B em raízes, o BOR5 não apresentou co-expressão com os outros genes; isso ocorreu apenas quando feita aplicação foliar de B (Quadro 8).

#### 4 DISCUSSÃO

O  $\Psi_{wf}$  é uma boa referência das condições hídricas da planta, particularmente durante períodos de seca (Levitt, 1980) e neste estudo observamos que a intensificação do déficit hídrico causou redução do  $\Psi_{wf}$  das plantas de eucalipto indicando que a condição imposta afetou o conteúdo de água nas folhas (Figura 2). Alguns trabalhos têm indicado que plantas tolerantes à restrição hídrica possuem maior  $\Psi_{wf}$  em comparação com aquelas menos tolerantes, devido à presença de mecanismos que podem postergar a desidratação celular (Jongdee et al., 2002).

Lehto et al. (2010) sugerem que o B pode possivelmente influenciar esta tolerância por seu efeito na função estomática. As plantas que receberam B na solução mostraram  $\Psi_{wf}$  maior do que as que foram submetidas à omissão de B (Figura 2), o que seria um reflexo do efeito positivo do nutriente no grau de hidratação foliar. Quando a deficiência de B é suficientemente severa para causar danos estruturais pode comprometer a função estomática e taxa fotossintética (Zhao & Oosterhuis, 2002; Han et al., 2008).

A aplicação de B via foliar favoreceu a manutenção de maiores valores do  $\Psi_{wf}$  durante o período de restrição hídrica (Figura 2). Estes resultados são contrários aos obtidos para *Picea abies* (Möttönen et al., 2001; Möttönen et al., 2005). Os maiores  $\Psi_{wf}$  podem ser indicativo de que a presença do nutriente favorece o ajustamento osmótico e, ou, induz o crescimento radicular facilitando a absorção de água. Esta afirmação pôde ser comprovada neste trabalho, que mostrou que o maior crescimento radicular foi favorecido pela presença de B na solução ou por meio de sua aplicação em folhas maduras (Figura 8). De forma semelhante, em *Picea abies* foi observado maior crescimento em comprimento radicular, número de raízes e matéria seca em plantas suplementadas com B e submetidas à restrição hídrica (Möttönen et al., 2005; Möttönen et al., 2001a,b). A ausência do nutriente, mesmo em boa disponibilidade hídrica também restringiu o crescimento radicular desta espécie (Räisänen et al., 2007).

Um maior  $\Psi_{wf}$ , decorrente da maior absorção de água, poderia levar ao aumento da condutância estomática e taxa transpiracional, como observado por Nunes (2010), com conseqüente maior assimilação de carbono, resultando em maior crescimento pelas plantas durante estresse hídrico. Sob tal condição, permitiria a planta suportar a maior taxa de acúmulo da matéria seca da parte aérea decorrente do efeito da aplicação de B durante o período de restrição hídrica (Figura7).

A aquisição de B pelo sistema radicular durante períodos de escassez hídrica é limitada devido ao menor fluxo transpiracional da planta (Mattiello et al., 2009a) e em condições limitantes para absorção do nutriente, transportadores de B, energeticamente dependentes, podem atuar facilitando a entrada do nutriente através das raízes (Stangoulis et al., 2001; Takano et al., 2002; Tanaka et al., 2008).

Os transportadores do tipo BOR, localizados na membrana plasmática do estelo radicular estão envolvidos no carregamento de B para o xilema (Takano et al., 2002; Takano et al., 2005; Miwa & Fujiwara, 2010) e facilitam a aquisição e direcionamento de B para parte aérea, principalmente diante de baixa disponibilidade do elemento na solução do solo. Entretanto, de acordo com Sun et al. (2010), a translocação mais generalizada de B em diferentes tipos de células e em múltiplos tecidos, que inclui os tecidos parenquimáticos e vasculares, também é uma das várias funções destes transportadores.

Os genes At BOR1 e Os BOR1, também relacionados ao transporte de íons, são requeridos para o crescimento normal de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, respectivamente, sob baixa disponibilidade de B (Takano et al., 2002; Nakagawa et al., 2007), resultado semelhante ao observado neste trabalho para BOR2, que teve sua expressão aumentada na ausência do nutriente (Figuras 9E, 9F) ao contrário dos dois outros genes aqui estudados, que possuíram expressão induzida com o aumento nos níveis de boro. Nunes (2010) observou que em eucalipto submetidos à restrição hídrica ocorreu maior expressão do gene BOR1 nas plantas cultivadas na presença de B. Cabe ressaltar que os mecanismos e atuação dos transportadores de B ainda são desconhecidos e mais estudos são requeridos para elucidá-los (Park et al., 2008).

Sob condições de déficit hídrico, observou-se que a aplicação de B em folha madura foi mais eficiente na manutenção do turgor foliar, o que provavelmente possuiu efeito

positivo no crescimento da parte aérea e sistema radicular. Além disso, aplicação de B em folha madura produziu os maiores aumentos na expressão dos transportadores BOR5 e BOR cl6871 em folhas, permitindo sugerir a hipótese que maior translocação de boro para as raízes ocorre a partir das folhas maduras, e que esta aplicação seria suficiente para aumentar a matéria do sistema radicular.

Mesmo que a mobilidade do B seja restrita em algumas plantas (Oertli & Richardson, 1970; Raven, 1980), neste trabalho ela se mostrou acentuada, como se pode deduzir pelo aumento dos teores do nutriente em folhas jovens, cinco dias após aplicação foliar (Figura 4). Brown & Hu (1996) observaram mobilidade do B em algumas espécies arbóreas, como *Malus* e *Prunus*, e em *Coffea*, poderia estar relacionado com a concentração interna do nutriente (Leite et al., 2007). Em clone de eucalipto mais tolerante a deficiência de B, Mattiello et al. (2009b) demonstraram que no 1º dia após a aplicação de  $^{10}\text{B}$  em uma única folha madura já foi possível detectar o nutriente em folhas jovens e raízes de eucalipto, suportando assim sua relativa mobilidade.

Os fatores que favorecem o carregamento de B pelo xilema e sua translocação pelo floema são pouco elucidados, com indícios que sua translocação se dê na presença de polióis, como manitol e sorbitol (Hu et al., 1997). Em transgênicos de *Oryza sativa* a produção induzida de sorbitol favoreceu a translocação de B (Bellaloui et al., 2003). Outros autores (Noiraud et al., 2001; Šircelj et al., 2005) mostraram que plantas sob estresse hídrico apresentaram aumento na concentração de carboidratos solúveis, como o sorbitol e manitol. Tem sido demonstrado que a enzima M-6-PR (NADPH manose-6-fosfato redutase), que catalisa a conversão da manose-6-fostato para manitol-6-fosfato, tem maior atividade em folhas maduras (Stoop et al., 1996) e a mobilidade do B em plantas de eucalipto foi maior quando sua aplicação foi feita, via foliar, juntamente com manitol em comparação com sua aplicação isolada (São José et al., 2009). No presente trabalho, as melhores respostas foram obtidas quando a aplicação de B foi realizada em folha madura. Isto sugere que o bom suprimento de carboidratos nestas folhas poderia favorecer a maior translocação do nutriente no eucalipto.

Durante períodos de restrição hídrica, a complexação do B e polióis e sua retranslocação da parte aérea para o sistema radicular poderia ser uma forma de movimentação de compostos orgânicos, fonte de esqueleto carbônico, necessários para o

crescimento radicular (Nunes, 2010). Este mesmo autor observou aumento da expressão do gene relacionado ao transporte de polióis (PtrPLT) em folhas de eucalipto submetidos à restrição hídrica, além disso esses transportadores podem propiciar suprimento de C orgânico, através da redistribuição de fotoassimilados, para a síntese de parede celular (Klepek et al., 2010).

Como maior parte do B encontra-se na parede celular, ligado às pectinas (O'Neill et al., 2001), sua mobilização deve então envolver a liberação do nutriente da parede celular e seu transporte pelo sistema vascular. Para síntese e alteração de compostos pécnicos constituintes da parede celular faz-se necessário a atuação de alguns tipos de enzimas. As PMEs são importantes para o enrijecimento da parede celular (Moustacas et al., 1991), essenciais no processo de alongamento do sistema radicular (Al-Qsous et al., 2004) e agem adicionando grupos metil aos grupamentos carboxil dos compostos pécnicos (Ishikawa et al., 2000). Já as GT participam de reações de transferência de açúcares entre moléculas (Ross et al., 2001), são importantes enzimas de formação e degradação dos compostos pécnicos e ausência de sua atividade pode reduzir em até 25% o conteúdo de ácidos galacturônicos (Bouton et al., 2002), principais constituintes da pectina (Taiz & Zeiger, 2009).

Neste estudo, constatamos que na ausência de B ocorreu a redução da taxa transcricional dos genes PME3 e GTP8, em torno de 50 % em raízes (Figura 10). Estes resultados se assemelham aos obtidos para raízes de *Arabidopsis thaliana*, nas quais a PME2 teve sua expressão reduzida em 50% quando as plantas foram submetidas à restrição de B (Camacho-Cristóbal et al., 2008). Os resultados aqui apresentados se assemelham também aos observados em raízes de clone de eucalipto tolerante à seca que, quando submetido ao estresse hídrico e ao suprimento de B teve a expressão da PME3 aumentada (Nunes, 2010).

A expressão da GTP8 durante os períodos de restrição hídrica foi induzida pela suplementação com B, principalmente pela aplicação via foliar (Figura 10). A ausência desse gene pode resultar em menor adesão entre as células foliares e radiculares facilitando a desidratação dessas (Bouton et al., 2002). O fato de que tanto a seca como o B aumentarem a expressão destas duas enzimas, e que o efeito destes dois fatores é sinérgico

na expressão destes genes, sugerindo que a mobilização do B das pectinas, para translocá-lo às raízes e a outras partes da planta, pode depender da atuação destas duas enzimas.

Leucci et al. (2008) demonstraram que as raízes de variedade de trigo tolerante à seca apresentaram incremento das cadeias dos RG I (ramnogalacturonanos I) e, ou, RG II (ramnogalacturonanos II) em resposta à restrição hídrica. Assim, de acordo com os autores, a possibilidade de aumentar a tolerância ao estresse pode estar relacionada ao aumento da síntese de cadeias pécnicas, nas quais estes compostos podem atuar como agentes gelificantes bem como anti-dessecantes. Cabe ressaltar que o B participa ativamente dos RG II, por meio da formação das ligações B-diéster, responsáveis pela integridade da cadeia pécnica (O'Neill et al., 2004).

Nunes (2010) constatou maior expressão diferencial dos genes relacionados à síntese e alteração dos compostos pécnicos (GTP8 e PME) e transporte de B (BOR1 e BOR 2) no clone de eucalipto tolerante à seca cultivado sob restrição hídrica e suplementado com B, em comparação ao clone sensível. Este fato é um indicativo da participação destes genes na tolerância a déficit hídrico.

No presente estudo, a maior expressão dos genes (BOR5, BOR cl6871, GTP8 e PME3) durante a restrição hídrica principalmente quando feita aplicação via foliar, e a provável translocação do B observada neste trabalho, podem ser mais um indicativo da importância do nutriente estudado na melhor adequação às condições de restrição hídrica as quais as plantas foram submetidas. Além disso, evidencia-se também que o GTP8 foi o gene com maior expressão sob déficit hídrico (Figura 10) e teve alta correlação com os transportadores de B (BOR 5 e BOR cl6871) quando realizada aplicação do nutriente em folha madura (Quadro 8), sugerindo a importância da aquisição e transporte de B na síntese e alteração dos compostos formadores da parede celular.

Diante do exposto, evidencia-se a importância do suprimento de B via solo, em períodos anteriores à estação seca para aumentar a robustez das plantas tornando-as menos sujeitas aos danos causados pelo déficit hídrico. Entretanto, em períodos de seca prolongada, como se observa no Cerrado brasileiro, há limitação na absorção do nutriente pela raiz, em razão da menor disponibilidade hídrica, e sua aplicação via foliar, principalmente em folhas basais, é sugerida diante dos benefícios observados no presente trabalho.

## 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 Struct. Exp.* 1730:56-65, 2005.
- ALTHOFF, P.; OLIVEIRA, A.C.; MORAIS, E.J. & FONSECA, S. Eucalypt dieback in cerrado areas in North-Northwest of Minas Gerais. In: Schonau, A.P.G. (ed.) *Symposium on Intensive Forestry: The role of eucalypts*. Southern African Institute of Florestry. Pretoria. 1991, p.598-609.
- AL-QSOUS, S.; CARPENTIER, E.; KLEIN-EUDE, D.; BUREL, C.; MAREK, A.; DAUCHEL, H.; GOMORD, V.; BALANGE, A.P. Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta*, 219:369-378, 2004.
- BELLALLOUI, N.; YADAVC, R.C.; CHERN, M-S.; HU, H.; GILLEN, A.M.; GREVE, C.; ABHAYA, M.D.; RONALD, P.C.; BROWN, P.H. Transgenically enhanced sorbitol synthesis facilitates phloem-boron mobility in rice. *Physiol. Plant.*, 117:79-84, 2003.
- BOUTON, S.; LEBOEUF, E.; MOUILLE, G.; LEYDECKER, M.T.; TALBOTEC, J.; GRANIER, F.; LAHAYE, M.; HÖFTE, H.; TRUONG, H.N. Quasimodo1 encodes a putative membrane-bound glycosyltransferase required for normal pectin synthesis and cell adhesion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14: 2577-2590, 2002.
- BROWN, P.H. & HU, H. Phloem mobility of boron is species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Annals of Botany*, 77: 497-505, 1996.
- BROWN, P.H. & HU, H. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiol. Plant.*, 91:435-441, 1994.
- CAMACHO-CRISTÓBAL, J.J.; HERRERA-RODRIGUÉZ, M.B.; BEATO, V.M.; REXACH, J.; NAVARRO-GOCHICOA, M.T.N.; MALDONADO, J.M.; GONZÁLEZ-FONTES, A. The expression of several cell wall-related genes in *Arabidopsis* roots is down-regulated under boron deficiency. *Environ. Exp. Botany*, 63:351-358, 2008.
- CAKMAK, I & ROMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant and Soil*, 193:71-83, 1997.
- CLARK, R.B. Characterization of phosphates in intact maize root. *J. Agric. Food Chem.*, 23:458-460, 1975.

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.

HU, H. & BROWN, P.H. Absorption of boron by plants. *Plant Soil*, 193:49-58, 1997.

HU, H. & BROWN, P.H. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin. *Plant Physiol.*, 105:681-689, 1994.

HU, H.; PEN, S.G.; LEBRILLA, C.B.; BROWN, P.H. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol.*, 113:649-655.

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<sup>+</sup>-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *Plant Cell.*, 17:204-218, 2005.

ISHIKAWA, M.; KUROYAMA, H.; TAKEUCHI, Y. & TSUMURAYA, Y. Characterization of pectin methylesterase from soybean hypocotyls. *Planta*, 210:782-791, 2000.

JONGDEE, B.; FUKAI, S.; COOPER, M. Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Res.*, 76:153-163, 2002.

KATO, Y.; MIWA, K.; TAKANO, J.; WADA, M.; FUJIWARA, T. Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5;1, a boric acid channel. *Plant Cell Physiol.*, 50:58-66, 2009.

LEHTO, T.; RÄISÄNEN, A.; LAVOLA, A.; JULKUNEN-TIITTO, R.; APHALO, P.J. Boron mobility in deciduous forest trees in relation to their polyols. *New Phytol.*, 163:333-339, 2004.

LEHTO, T.; RUUHOLA, T.; DELL, B. Boron in forest trees and forest ecosystems. *For. Ecol. Manag.*, 260: 2053-2069, 2010.

LEITE, V.M.; BROWN, P.H.; ROSOLEM, C.A. Boron translocation in coffee trees. *Plant Soil*, 290:221-229, 2007.

LEUCCI, M.R.; LENUCCI, M.S.; PIRO, G.; DALESSANDRO, G. Water stress and cell wall polysaccharides in the apical root zone of wheat cultivars varying in drought tolerance. *J. Plant Physiol.*, 165:1168-1180, 2008.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. Water relation, salt and other stresses, vol. 2, 2<sup>nd</sup> Edition. Academic Press, New York, 1980. 606p.



- LUKASZEWSKI, K.M & BLEVINS, D.G. Root growth inhibition in boron-deficient or aluminium-stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant Physiol.*, 112:1135-1140, 1996.
- 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. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1281-1290, 2009a.
- MATTIELLO, E.M.; RUIZ, H.A.; SILVA, I.R.; SARKIS, J.E.S.; NEVES, J.C.L & PUCCI, M.M. Phloem mobility of boron in two eucalypt clones. *R. Bras. Ci. Solo*, 33: 1695-1704, 2009b.
- MATOH, T.; KAWAGUCHI, S.; KOBAYASHI M. Ubiquity of a borate rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant Cell Physiol.*, 37:636-640, 1996.
- MICHEL, B.E & KAUFMANN, M.R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.*, 51:914-916, 1973.
- MIWA, K & FUJIWARA, T. Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany*, 1-6, 2010.
- MOUSTACAS, A.M.; NARI, J.; BOREL, M.; NOAT, G.; RICARD, J. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension. *Bioch. J.*, 279:351-354, 1991.
- MÖTTÖNEN, M., APHALO, P.J., LEHTO, T. The role of boron in drought resistance in Norway spruce (*Picea abies*) seedlings. *Tree Physiol.* 21:673–681, 2001a.
- MÖTTÖNEN, M.; LEHTO, T.; RITA, H.; APHALO, P. Recorey of Norway spruce (*Picea abies*) seedling from repeated drought as affected by boron nutrition. *Trees*, 19:213-223, 2005.
- MÖTTÖNEN, M., LEHTO, T., APHALO, P.J. Growth dynamics and mycorrhizas of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings in relation to boron availability. *Trees*, 15:319-326, 2001b.
- 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. *The Plant Cell*, 19: 262402635, 2007.
- NOIRAUD, N.; MAUROUSSET, L.; LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem*, 39:717-728, 2001.

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

O'NEILL, M.A.; EBERHARD, E.; 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 pectin polysaccharide, *Ann. Rev. Plant Biol.*, 55:109-139, 2004.

OERTLI, J.J. & RICHARDSON, W.F. The mechanism of boron immobility in plants. *Physiol. Plant.*, 23:108-116, 1970.

PARK., J.; KIM, Y.Y.; MATINOIA, E.; LEE, Y. Long-distance transporters of inorganic nutrients in plants. *J.Plant Biol.*, 51:240-247, 2008.

PELLOUX, J.; RUSTÉRUCCI, C. & MELLEROWICZ, E. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sc.*, 12: 265-277, 2007.

RÄISÄNEN, M.; REPO, T.; LEHTO, T. Cold acclimation was partially impaired in boron deficient Norway spruce seedling. *Plant Soil*, 292: 271-282, 2007.

RAVEN, J.A. Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.*, 84:231-249, 1980.

ROSS, J.; LI, Y.; LIM, E.K.; BOWLES, D.J. Higher plant glycosyltransferases. *Gen. Biol.*, 2:1-6, 2001.

SÃO JOSÉ, J.F.B.; SILVA, I.V.; BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; SILVA, E.F.; SMYTH, T.J.; LEITE, F.P.; NUNES, F.N.; GEBRIM, F.O. Boron mobility in *Eucalyptus* clones. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1733-1744, 2009.

SCHEIBLE, W.R. & PAULY, M. Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis : novel players and insights. *Cur. Op. Plant Biol.*, 7:285-295, 2004.

ŠIRCELJ, H.; TAUSZ, M.; GRILL, D.; BATIC, F. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *J. Plant Physiol.*, 162:1308-1318, 2005.

SHON, M.K.; NOVACKY, A. & BLEVINS, D.G. Boron induces hyperpolarization of sunflower root cell membranes and increases membrane permeability to K<sup>+</sup>. *Plant Physiol.*, 93:566-571, 1990.

STANGOULIS, J.C.R.; REID, R.J.; BROWN, P.H.; GRAHAM, R.D. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta*, 213:142-146, 2001.

- STAVRIANAKOU, S.; LIAKOPOULOS, G & KARABOURNIOTIS, G. Boron deficiency effects on growth, photosynthesis and relative concentrations of phenolics of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae). *Env. Exp. Botany*, 56:293-300, 2006.
- STOOP, J.M.H.; WILLIAMSON, J.D.; PHARR, D.M. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends Plant Sci.*, 1:1385-1396, 1996.
- SUN, J.; SHI, L.; ZHANG, C.; XU, F. Cloning and characterization of boron transporters in *Brassica napus*. *Mol. Biol. Rep.*, jun, 11, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3a.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719p.
- TAKANO, J.; MIWA, K.; YUAN, L.; 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.; MASAHARU, K.; GADJOS, Z.; MIWA, K.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T.; FUJIWARA, T. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420:337-340, 2002.
- TANAKA, M & FUJIWARA, T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Eur. J. Physiol.*, 456:671-677, 2008.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. 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.
- WEN, F.; ZHU, Y.; HAWES, M.C. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *The Plant Cell*, 11:1129-1140, 1999.
- WILSON, K. & WALKER, K. *Principles and techniques of practical biochemistry*. 5a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.784 p.
- WINGENDER, Q.Y.; SCHULZ, M. & GOLDBACH, H.E. Short-term boron deprivation induces increased levels of cytoskeletal proteins in *Arabidopsis* roots. *Plant Biol.*, 3:335-340, 2001.
- WOLF, B. Improvement in the azometine-H method for determination of boron. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 5:39-44, 1974.
- ZHAO, D., OOSTERHUIS, D.M. Cotton growth and physiological responses to boron deficiency. *J. Plant. Nutr.* 26:855-867, 2003.

## **APÊNDICE**

Quadro 4: Análise de variância do potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ), teor de boro nas folhas maduras (TBFM), folhas jovens (TBFJ) e raízes (TBR), matéria seca total (MST), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raízes (MSR), considerando os tratamentos aplicados

FV	GL	Quadrado Médio						
		$\Psi_{wf}$	TBFM	TBFJ	TBR	MST	MSPA	MSR
Tratamentos	29	1,0698*	530,20*	538,66*	491,40*	171,06*	108,24*	8,42*
Resíduo	87	0,0025	13,80	6,19	18,70	6,11	5,03	0,89
CV (%)		11,9	8,14	9,57	12,96	23,87	21,81	28,00

\*, significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 5: Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de B e síntese e degradação da parede celular em folhas, nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e com disponibilidade hídrica adequada

Tratamentos	-B BOR 2	-B BOR 5	-B BOR cl*	-B GTP 8	-B PME 3	+B BOR 2	+B BOR 5	+B BOR cl*	+B GTP 8	+B PME 3
-B BOR 2	1,000									
-B BOR 5	-0,276	1,000								
-B BOR cl*	0,682	-0,891	1,000							
-B GTP 8	-0,833	0,761	-0,973	1,000						
-B PME 3	0,338	0,811	-0,458	0,239	1,000					
+B BOR 2	-0,623	-0,580	0,148	0,087	-0,947	1,000				
+B BOR 5	-0,529	-0,669	0,259	-0,028	-0,977	0,993	1,000			
+B BOR cl*	-0,640	0,915	-0,998	0,958	0,507	-0,202	-0,313	1,000		
+B GTP 8	-0,335	-0,813	0,461	-0,241	-1,000	0,946	0,977	-0,509	1,000	
+B PME 3	0,100	-0,984	0,796	-0,633	-0,903	0,716	0,791	-0,828	0,904	1,000

\*=abreviação de BOR cl6871

Quadro 6: Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de B e síntese e degradação da parede celular em folhas, nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folhas madura (BFM) ou jovem (BFJ) sob restrição hídrica

Tratamentos	-B BOR 2	-B BOR 5	-B BORcl*	-B GTP 8	-B PME 3	+B BOR 2	+B BOR 5	+B BORcl*	+B GTP 8	+B PME 3	BFM BOR 2	BFM BOR 5	BFM BORcl*	BFM GTP 8	BFM PME 3	BFJ BOR 2	BFJ BOR 5	BFJ BORcl*	BFJ GTP 8	BFJ PME 3	
-B BOR 2	1,000																				
-B BOR 5	0,964	1,000																			
-B BORcl*	0,993	0,925	1,000																		
-B GTP 8	0,899	0,750	0,945	1,000																	
-B PME 3	-0,899	-0,751	-0,946	-1,000	1,000																
+B BOR 2	0,949	0,831	0,980	0,991	-0,992	1,000															
+B BOR 5	-0,079	0,188	-0,200	-0,508	0,507	-0,391	1,000														
+B BORcl*	-0,160	0,108	-0,279	-0,576	0,576	-0,464	0,997	1,000													
+B GTP 8	-0,657	-0,433	-0,743	-0,921	0,920	-0,862	0,804	0,850	1,000												
+B PME 3	-0,995	-0,986	-0,975	-0,850	0,851	-0,912	-0,022	0,060	0,577	1,000											
BFM BOR 2	-0,968	-1,000	-0,930	-0,760	0,760	-0,838	-0,174	-0,093	0,446	0,988	1,000										
BFM BOR 5	-0,141	0,127	-0,260	-0,561	0,560	-0,447	0,998	1,000	0,839	0,041	-0,112	1,000									
BFM BORcl*	0,394	0,624	0,280	-0,049	0,047	0,083	0,885	0,844	0,434	-0,485	-0,613	0,854	1,000								
BFM GTP 8	0,822	0,944	0,747	0,490	-0,491	0,600	0,502	0,430	-0,111	-0,875	-0,939	0,447	0,847	1,000							
BFM PME 3	0,972	0,875	0,993	0,977	-0,977	0,996	-0,311	-0,388	-0,816	-0,943	-0,881	-0,370	0,167	0,665	1,000						
BFJ BOR 2	-0,625	-0,396	-0,716	-0,904	0,904	-0,840	0,827	0,870	0,999	0,544	0,409	0,861	0,471	-0,070	-0,791	1,000					
BFJ BOR 5	-0,973	-0,999	-0,938	-0,774	0,775	-0,851	-0,152	-0,071	0,466	0,991	1,000	-0,090	-0,594	-0,931	-0,892	0,430	1,000				
BFJ BORcl*	0,441	0,664	0,329	0,003	-0,004	0,135	0,860	0,815	0,387	-0,529	-0,653	0,826	0,999	0,874	0,218	0,424	-0,635	1,000			
BFJ GTP 8	0,960	1,000	0,919	0,741	-0,742	0,823	0,202	0,121	-0,420	-0,984	-1,000	0,140	0,635	0,948	0,868	-0,383	-0,999	0,674	1,000		
BFJ PME 3	0,544	0,747	0,438	0,121	-0,122	0,250	0,794	0,741	0,276	-0,625	-0,737	0,754	0,986	0,925	0,331	0,315	-0,722	0,993	0,756	1,000	

\*=abreviação de BOR cl6871

Quadro 7: Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de B e síntese e degradação da parede celular em raízes, nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e com disponibilidade hídrica adequada

	-B BOR 2	-B BOR 5	-B BORcl	-B GTP 8	-B PME 3	+B BOR 2	+B BOR 5	+B BORcl	+B GTP 8	+B PME 3
-B BOR 2	1,000									
-B BOR 5	-0,947	1,000								
-B BORcl	0,779	-0,536	1,000							
-B GTP 8	-0,899	0,710	-0,975	1,000						
-B PME 3	-0,909	0,726	-0,970	1,000	1,000					
+B BOR 2	-0,639	0,359	-0,980	0,912	0,902	1,000				
+B BOR 5	-0,984	0,989	-0,655	0,806	0,820	0,492	1,000			
+B BORcl	0,484	-0,177	0,926	-0,819	-0,805	-0,982	-0,320	1,000		
+B GTP 8	-0,943	0,787	-0,943	0,993	0,996	0,858	0,869	-0,747	1,000	
+B PME 3	-0,991	0,895	-0,856	0,949	0,956	0,737	0,951	-0,597	0,979	1,000

\*=abreviação de BOR cl6871



Quadro 8: Matriz de correlação de Spearman do padrão quantitativo de co-expressão dos genes relacionados com o transporte de B e síntese e degradação da parede celular em raízes, nos tratamentos aclimatados na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folhas madura (BFM) ou jovem (BFJ) sob restrição hídrica

	-B BOR 2	-B BOR 5	-B BORcl*	-B GTP 8	-B PME 3	+B BOR 2	+B BOR 5	+B BORcl*	+B GTP 8	+B PME 3	BFM BOR 2	BFM BOR 5	BFM BORcl*	BFM GTP 8	BFM PME 3	BFM BOR 2	BFM BOR 5	BFM BORcl*	BFM GTP 8	BFM PME 3	
-B BOR 2	1,000																				
-B BOR 5	-0,003	1,000																			
-B BORcl*	0,953	-0,305	1,000																		
-B GTP 8	1,000	0,013	0,948	1,000																	
-B PME 3	0,959	-0,287	1,000	0,954	1,000																
+B BOR 2	0,801	-0,601	0,944	0,792	0,938	1,000															
+B BOR 5	0,520	0,853	0,238	0,533	0,255	-0,095	1,000														
+B BORcl*	0,964	-0,268	0,999	0,960	1,000	0,931	0,274	1,000													
+B GTP 8	1,000	0,014	0,948	1,000	0,954	0,791	0,534	0,959	1,000												
+B PME 3	-0,340	0,941	-0,608	-0,325	-0,593	-0,835	0,627	-0,578	-0,324	1,000											
BFM BOR 2	-0,997	-0,069	-0,929	-0,998	-0,936	-0,756	-0,580	-0,942	-0,998	0,271	1,000										
BFM BOR 5	0,561	0,826	0,285	0,574	0,302	-0,046	0,999	0,321	0,575	0,588	-0,619	1,000									
BFM BORcl*	0,759	0,649	0,527	0,769	0,542	0,218	0,951	0,558	0,770	0,355	-0,804	0,965	1,000								
BFM GTP 8	0,997	0,079	0,926	0,998	0,932	0,750	0,588	0,939	0,998	-0,262	-1,000	0,627	0,809	1,000							
BFM PME 3	0,986	0,163	0,890	0,989	0,898	0,691	0,654	0,907	0,989	-0,180	-0,996	0,690	0,856	0,996	1,000						
BFJ BOR 2	-0,916	0,404	-0,994	-0,910	-0,992	-0,974	-0,133	-0,990	-0,909	0,689	0,885	-0,182	-0,434	-0,880	-0,837	1,000					
BFJ BOR 5	0,714	0,697	0,470	0,726	0,486	0,154	0,969	0,503	0,726	0,415	-0,763	0,980	0,998	0,769	0,820	-0,374	1,000				
BFJ BORcl	0,752	0,657	0,518	0,762	0,533	0,208	0,954	0,549	0,763	0,365	-0,797	0,968	1,000	0,803	0,850	-0,424	0,999	1,000			
BFJ GTP 8	0,999	-0,056	0,968	0,998	0,972	0,831	0,474	0,977	0,998	-0,389	-0,992	0,517	0,723	0,991	0,976	-0,936	0,677	0,716	1,000		
BFJ PME 3	0,971	-0,241	0,998	0,967	0,999	0,921	0,301	1,000	0,967	-0,554	-0,951	0,347	0,582	0,948	0,918	-0,985	0,527	0,573	0,982	1,000	

\*=abreviação de BOR cl6871

Quadro 9: Média dos tratamentos para potencial hídrico foliar ( $\Psi_{wf}$ ), teores de boro em folhas maduras (TBFM), teores de boro em folhas jovens (TBFJ), teores de boro em relação aos dias e tratamentos aplicados

Tempo (d)	Média das variáveis coletadas					
	$\Psi_{wf}$					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	-0,048	-0,043	-0,078	-0,060	-0,060	-0,070
5	-0,050	-0,050	-0,150	-0,070	-0,122	-0,130
10	-0,050	-0,050	-0,650	-0,620	-0,460	-0,580
15	-0,070	-0,054	-0,990	-0,940	-0,840	-0,886
20	-0,058	-0,050	-1,530	-1,460	-1,400	-1,450
	TBFM					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	40,47	55,32	46,04	53,35	50,36	44,82
5	33,93	47,37	36,23	43,79	52,40	41,03
10	29,97	43,75	39,09	41,36	37,24	40,12
15	27,50	42,39	28,82	32,87	36,00	
20	57,84	64,36	61,32	65,96	66,27	63,95
	TBFJ					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	23,21	35,87	25,59	32,93	23,25	24,43
5	20,25	31,22	24,87	30,38	56,84	46,14
10	15,91	21,82	16,81	22,91	17,85	19,06
15	20,78	26,80	23,33	29,21	26,05	
20	42,47	50,93	8,23	13,15	8,52	15,19
	TBR					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	17,23	29,72	31,85	35,95	24,64	18,98
5	32,45	35,82	41,72	34,53	38,10	23,66
10	23,07	26,28	21,90	19,17	25,42	20,71
15	32,45	46,47	30,57	44,93	43,58	
20	35,66	36,92	60,21	60,89	34,32	40,57

Quadro 10: Média dos tratamentos para matéria seca total (MST), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca de raízes (MSR) em relação aos dias e tratamentos aplicados

Tempo (d)	Média das variáveis coletadas					
	MST					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	4,60	12,57	5,30	10,80	7,98	8,29
5	5,61	13,46	5,86	11,30	11,53	13,02
10	8,04	18,68	10,72	16,73	12,42	13,53
15	11,37	29,46	12,48	16,33	15,94	
20	16,79	33,65	14,67	17,18	21,77	15,75
	MPA					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	3,56	9,69	3,54	8,38	5,96	5,41
5	3,81	10,06	3,96	8,67	9,22	9,40
10	6,24	13,79	7,88	12,91	9,22	10,67
15	8,24	23,12	9,44	11,77	12,08	
20	13,29	26,85	11,31	13,29	14,86	11,59
	MSR					
	SS -B	SS +B	CS -B	CS +B	CS BFM	CS BFJ
1	1,04	2,88	1,76	2,43	2,03	2,88
5	1,80	3,41	1,90	2,63	2,31	3,62
10	1,80	4,89	2,85	3,81	3,20	2,86
15	3,13	6,34	3,04	4,56	3,85	
20	3,51	6,80	3,36	3,89	6,92	4,16

Quadro 11: Média dos valores de Ct dos primers constitutivos, ribonucleoproteína (Ribo) e histona 2B (H2B), dos primers relacionados a transporte e absorção de íons, (BOR5, BOR cl6871 e BOR2) e dos primers relacionados à síntese de parede, glicosil transferase isoforma 8 (GTP8) e pectina metilesterase (PME3) em folhas por PCR em tempo real em resposta ao potencial hídrico da solução e aclimação na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folhas madura (BFM) ou jovem (BFJ)

Média dos valores de Ct em folhas								
$ \Psi_w $	B	Ribo	H2B	BOR 5	BOR cl*	BOR2	PME3	GTP8
0	-B	24,53	24,88	26,77	28,41	30,59	30,86	30,91
0	+B	25,04	25,48	27,02	27,45	30,26	30,65	30,49
0.15	-B	25,61	25,74	28,10	28,08	30,83	30,59	31,88
0.15	+B	25,68	25,24	26,99	27,82	31,30	30,22	30,45
0.15	BFM	26,53	25,57	27,03	28,37	31,38	30,55	31,82
0.15	BFJ	24,40	24,25	26,04	26,90	29,46	29,74	30,64
0	-B	24,36	23,78	26,91	28,07	30,96	31,26	30,93
0	+B	25,98	25,27	27,86	28,64	31,21	31,58	31,36
0.65	-B	25,27	25,20	27,02	27,85	30,71	31,58	31,60
0.65	+B	24,89	25,13	26,13	26,81	31,08	30,16	29,86
0.65	BFM	27,12	27,24	27,26	27,59	32,40	30,86	31,45
0.65	BFJ	25,98	25,37	28,11	27,42	31,41	31,07	31,05
0	-B	25,59	24,79	28,23	28,67	31,69	32,36	32,40
0	+B	26,13	26,08	28,07	28,82	31,47	31,73	31,58
1.5	-B	26,07	25,79	27,78	28,86	31,69	32,56	32,09
1.5	+B	26,01	25,26	27,60	28,68	31,66	30,90	31,71
1.5	BFM	26,78	26,23	28,09	29,35	32,09	30,57	31,54
1.5	BFJ	24,47	24,17	26,33	27,57	30,62	30,05	29,86

\*=abreviação de BOR cl6871

Quadro 12: Média dos valores de Ct dos primers constitutivos, ribonucleoproteína (Ribo) e histona 2B (H2B), dos primers relacionados a transporte e absorção de íons, (BOR5, BOR cl6871 e BOR2) e dos primers relacionados à síntese de parede, glicosil transferase isoforma 8 (GTP8) e pectina metilesterase (PME3) em raízes por PCR em tempo real em resposta ao potencial hídrico da solução e aclimação na ausência (-B) ou presença (+B) de B e aplicação deste em folhas madura (BFM) ou jovem (BFJ)

		Média dos valores de Ct em raízes						
$ \Psi_w $	B	Ribo	H2B	BOR 5	BOR cl*	BOR2	PME3	GTP8
0	-B	25,01	24,59	22,56	27,24	21,31	20,09	22,83
0	+B	26,02	24,27	21,89	26,59	22,49	19,77	22,99
0.15	-B	25,40	25,23	21,81	26,35	21,22	21,47	22,07
0.15	+B	26,12	24,40	21,89	26,56	22,32	18,60	20,07
0.15	BFM	26,56	24,52	22,12	27,33	22,55	22,19	22,97
0.15	BFJ	24,54	24,60	21,02	26,17	20,78	20,30	21,41
0	-B	25,19	24,14	22,90	27,45	21,34	20,24	23,22
0	+B	25,79	24,99	21,82	26,58	22,53	19,65	22,81
0.65	-B	24,63	24,68	20,17	25,15	20,26	19,63	19,61
0.65	+B	25,86	24,42	20,53	25,78	22,04	17,96	19,86
0.65	BFM	27,54	23,11	21,97	26,50	23,75	19,73	21,21
0.65	BFJ	25,59	23,66	20,46	25,29	22,09	18,91	20,40
0	-B	25,85	24,62	23,61	27,59	21,60	21,96	25,66
0	+B	26,62	24,86	22,79	26,60	23,24	20,25	23,32
1.5	-B	25,36	26,35	21,94	26,10	21,31	20,07	20,90
1.5	+B	27,23	24,54	22,53	26,57	23,31	20,06	21,32
1.5	BFM	26,46	23,64	21,40	25,94	22,93	18,35	19,60
1.5	BFJ	25,30	24,42	20,58	25,35	22,29	17,83	19,48

\*=abreviação de BOR cl6871