

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Paola Mazza Revolti

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE UM MUTANTE EM
EUCALYPTUS

BOTUCATU – SP

2015

Paola Mazza Revolti

Caracterização morfológica de um mutante em *Eucalyptus*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas – Área de Concentração
Genética.

Orientador: Prof. Dr. Celso Luis Marino

Botucatu - SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Revolti, Paola Mazza.

Caracterização morfológica de um mutante em *Eucalyptus*
/ Paola Mazza Revolti. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Celso Luis Marino

Capes: 20203004

1. *Eucalyptus grandis* - Melhoramento genético. 2.
Genética vegetal. 3. Morfologia (Biologia). 4. Anatomia
vegetal.

Palavras-chave: Anomalia genética vegetal; *Eucalyptus*
grandis; Morfoanatomia.

Aos meus avós

Yolanda e João Mazza (in memoriam)

Santina e Domingo Revolti (in memoriam)

DEDICO

Aos meus pais

Elaine e Sérgio

Ao meu irmão

Lucas

À vida, e a todos que a tornaram mais especial...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Santa Izildinha por me acompanhar, abençoar meu caminho e me dar força para superar os obstáculos.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Marino, pela orientação, confiança, amizade e paciência.

À Suzano Papel e Celulose, pelo fornecimento de material genético para tornar possível a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

À Prof. Dra. Tatiane Maria Rodrigues pela ajuda e conhecimento na parte de anatomia vegetal.

À Prof. Dra. Martha Maria Mischan pela ajuda e ensinamentos de análise estatística.

Aos meus pais Elaine e Sérgio, pela vida, educação, amor, confiança e apoio.

Ao meu irmão Lucas pelo incentivo, ajuda e amizade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu, que me forneceu estrutura e condições para a completa realização do trabalho.

Aos colegas do laboratório CAGEM (Centro de Análises Genéticas e Moleculares), pela contribuição, convívio, alegrias e ajuda.

Ao meu namorado e amigo Walter do Carmo Pasquarelli Neto, pelo apoio, ajuda e por sempre estar ao meu lado.

À todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Somos, todos nós,
frutos dos livros que lemos,
das pessoas que amamos e
das viagens que fazemos.”*

Airton Ortiz

Resumo

Revolti MR. **Caracterização morfológica de um mutante em *Eucalyptus*** [tese]. Botucatu: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2015.

O *Eucalyptus* passou a ser um dos gêneros florestais mais plantados no mundo, devido a sua utilização na geração de diversos produtos comerciais. Com o intuito de aumentar a produtividade e introduzir características desejáveis o melhoramento genético florestal tem sido utilizado. Porém, alterações fisiológicas indesejáveis podem ocorrer, resultando em perdas e atrasos nos programas de melhoramento. A identificação e caracterização de genes relacionados a elas são importantes para os programas de melhoramento florestal. Melhoristas da empresa Suzano Papel e Celulose ao realizar um cruzamento controlado de *Eucalyptus grandis*, detectaram uma anomalia numa segregação mendeliana 3:1 (normais:anômalas), na progênie. As plantas anômalas apresentavam alterações em sua morfologia externa, como: altura das plantas, formato do limbo foliar, número de ramificações do caule, além da morte precoce dos indivíduos. Em estudos posteriores, com uso de marcadores moleculares, foi possível identificar uma marca molecular ligada à anomalia, mas nenhum estudo morfoanatômico foi realizado a fim de comparar as plantas anômalas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o estudo morfoanatômico, comparando-se os genótipos normal e anômalo na fase inicial de desenvolvimento das plantas, em busca de padrões diferenciais nas plantas mutantes. Para isso, amostras foram obtidas e processadas, segundo técnicas convencionais em anatomia vegetal e microscopia eletrônica de varredura. As plantas jovens de *Eucalyptus*, normais e anômalas, apresentaram diferenças morfológicas entre si. As plantas anômalas foram 3 vezes menores em altura que as normais e apresentaram caule bastante ramificado. Nas plantas normais, o caule apresentou maior área cortical e sistema vascular mais desenvolvido e organizado. Nas plantas anômalas, os tecidos vasculares são menos desenvolvidos e com aspecto colapsado. O limbo foliar das plantas normais apresentou formato elíptico e contorno levemente sinuoso; já nas plantas anômalas, o limbo foliar mostrou contorno bastante irregular. Estípulas mais desenvolvidas foram observadas associadas às folhas das plantas anômalas. O número de estômatos na face abaxial do limbo foliar das plantas normais foi superior ao encontrado nas folhas anômalas, com maior deposição de cera na face abaxial. As folhas das plantas normais apresentam maior comprimento do limbo foliar e maior número de cavidades oleíferas. Por outro lado, as folhas das plantas anômalas apresentam maior área de parênquima paliádico e maior quantidade de

espaços intercelulares. O sistema radicular nas plantas normais e anômalas é do tipo axial ou pivotante, apresentando cerca de 17-18 cm de comprimento em ambos os casos. Nas plantas normais foram observadas raízes mais espessas e maior número de ramificações e as raízes apresentaram zona cambial mais ampla, e xilema e floema mais desenvolvidos. As plantas anômalas apresentaram maior densidade de elementos de vasos e elementos de vasos com maior diâmetro.

Palavras-chave: Anomalia genética vegetal, *Eucalyptus grandis*, morfoanatomia.

ABSTRACT

Revolti MR. **Morphological characterization oh a mutant in *Eucalyptus*** [thesis]. Botucatu: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2015.

Eucalyptus has become one of the most planted forestry genus in the world, because of the use of many commercial products generation. Aiming to increase productivity and introduce desirable traits, forest genetic improvement techniques have been used. However, physiological changes may occur, resulting in loss and delay in improvement programs. The identification and characterization of genes related to diseases and anomalies are important for the forest improvement programs. In a controlled cross of *Eucalyptus grandis* individuals, the Suzano Papel and Celulose SA company has detected an anomaly with Mendelian segregation ratio of 3:1 (normal:abnormal) in the progeny. The abnormal plants showed notable changes in its external morphology, and early death of individuals. Previous studies have identified a molecular mark related to the anomaly, but no morphological and anatomical study was performed to compare the abnormal plants with the functions of the identified genes. In this way, the aim of this study was morphoanatomical analysis of normal and abnormal materials in the initial stage of development and evaluate phenotypic morphological characteristics in search of differential patterns in mutant plants. For this, samples were evaluated using conventional techniques in plant anatomy and scanning electron microscopy. The young plants of Eucalyptus, normal and anomalous showed morphological differences. The anomalous plants were 3 times smaller in height than the normal plants and presented a very branched stems. In normal plants, the stem showed higher cortical area and vascular system more developed and organized. In anomalous plants, the vascular tissues are less developed and with collapsed aspect. The leaf blades from normal plants showed elliptical shape and slightly sinuous contour; already in the anomalous plants, the leaf blade showed very irregular contour. More developed stipules were observed associated with the leaves of the anomalous plants. The number of stomata on the abaxial surface of the leaf blade of normal plants was higher than that found in anomalous leaves. The leaf blades from normal plants was more deposition of wax on the adaxial side, while the leaves of anomalous plants have increased deposition of wax in their abaxial surface. The leaves of normal plants have increased length of leaf blade and larger number of oil secreting cavities. On the other hand, the leaves of anomalous plants show a higher palisade parenchyma area and higher quantity of intercellular spaces. The root system in normal and anomalous plants is axial or pivoting

type, with approximately 17-18 cm length in both cases. In normal plant thicker roots thicker and more ramifications were observed. In normal plants, the roots had wider cambial area, and xylem and phloem more developed. The anomalous plants showed higher density of vessel elements and elements vessels of larger diameter.

Keywords: plant genetic anomaly, *Eucalyptus grandis*, morphoanatomy.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Revisão de Literatura.....	12
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	12
2.2 A genética e o melhoramento florestal.....	14
2.3 Genes deletérios e anomalias em eucalipto.....	16
2.4 Anatomia do eucalipto.....	17
3 Objetivos.....	20
4 Material e Métodos	21
4.1 Material vegetal	21
4.1.1 Produção das mudas.....	21
4.1.2 Coleta das mudas.....	21
4.2 Avaliações morfológicas.....	22
4.3 Microscopia de luz.....	22
4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	23
4.5 Metodologia estatística.....	23
5 Resultados e Discussão.....	25
5.1 Morfologia externa	25
5.2 Micromorfologia foliar (MEV).....	27
5.3 Análise anatômica.....	29
5.3.1 Limbo Foliar.....	29
5.3.2 Pecíolo.....	34
5.3.3 Caule.....	38
5.3.4 Raiz.....	43
5.4 Análise genética.....	46
5.4.1 Análise da folha.....	47
5.4.2 Análise do caule.....	49
5.4.3 Análise da raiz.....	50
6 Conclusões.....	51
7 Referências Bibliográficas	52

1 Introdução

O eucalipto pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledonea*, ordem *Myrtales*, família *Myrtaceae* e gênero *Eucalyptus*. É nativo do continente australiano e ilhas da Indonésia e passou a ser um dos gêneros florestais mais plantados no mundo, devido a sua utilização na geração de diversos produtos madeireiros e não madeireiros (GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008). No Brasil, foi introduzido no início do século XIX para fins comerciais, como o fornecimento de madeira para a produção de dormentes para os trilhos dos trens e materiais para a construção. Atualmente, a extensão das áreas plantadas e a sua produção aumentam a cada ano, pois as plantações brasileiras de *Eucalyptus* passaram a fornecer matéria-prima para a produção de carvão vegetal, painéis de madeira industrializada, madeira mecanicamente processada (compensados, serrados, portas, janelas, moldes para móveis, entre outros) e, principalmente, celulose e papel, destinados ao mercado interno e à exportação. O Brasil já conta com 5,1 milhões de hectares de áreas cultivadas distribuídas por todo o país, com destaque para as regiões sudeste e sul (ABRAF, 2013).

Com o intuito de aumentar a produtividade, introduzir características desejáveis para o mercado e reduzir impactos ambientais, técnicas de melhoramento genético florestal tem sido utilizadas (GOLLE et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013). A seleção dos genitores e os mecanismos de herança dos caracteres a serem selecionados são os dois aspectos fundamentais para os programas de melhoramento genético. Ambos requerem um conhecimento da constituição genética das espécies a fim de se obter, eficientemente, ganhos genéticos no melhoramento (BERED et al., 1997).

Em espécies florestais o melhoramento parte de uma população-base ou experimental, onde será realizada uma seleção individual ou seleção de procedências (GOLLE et al., 2009). Porém, o eucalipto necessita de um grande período para atingir o ciclo reprodutivo e por ser uma espécie alógama inviabiliza a produção de linhagens puras como as existentes em outras culturas, como em soja e milho, havendo assim apenas indivíduos com a maioria dos locos em heterozigose (ZOBEL e TALBERT, 1984). No entanto, alguns cruzamentos demonstram anomalias morfológicas e fisiológicas (KLEKOWSKI JR, 1988; ZOBEL e TALBERT, 1984) que podem resultar em: não formação ou germinação de sementes; presença de plantas anômalas, menores ou mais fracas morrendo prematuramente; e, raramente, plantas melhores (ZOBEL e TALBERT, 1984). Essas anomalias podem estar relacionadas à presença de alelos recessivos deletérios

presentes na carga genética da população e podem ser observadas em diferentes espécies, como *Antirrhinum majus* (HUIJSER et al., 1992), *Arabidopsis thaliana* (RÉDEI, 1975), *Oryza sativa* (KOH et al., 1999) e *Cucumis sativus* (MARX, 1983).

Tambarussi (2006) ao estudar um cruzamento controlado de *Eucalyptus grandis*, da empresa Suzano Papel e Celulose, detectou uma anomalia com segregação mendeliana 3:1 (8360 normais e 2880 anômalas) na progênie. As plantas anômalas morriam em poucos meses e possuíam como características: superbrotamento caulinar, redução de altura, redução drástica da área foliar e alteração na forma do limbo da folha. De acordo com esses resultados, o Centro de Análises Genéticas e Moleculares (CAGEM) vêm estudando as causas genéticas de tal anomalia, associadas com diferenças morfológicas e anatômicas, já que este é o primeiro relato em uma progênie de um cruzamento controlado gerando esse tipo de fenótipo em eucalipto.

Dessa forma, torna-se necessário uma caracterização morfoanatômica, no sentido de definir o efeito desses alelos na morfologia das plantas. Uma vez que o conhecimento da estrutura interna das plantas é fundamental para a compreensão de processos fisiológicos relacionados à produção vegetal (DICKSON, 2000).

2 Revisão de Literatura

2.1 O gênero *Eucalyptus*

Para atender a crescente demanda por produtos de base florestal, as áreas com florestas plantadas para fins comerciais têm aumentado gradativamente. Em vários países, em especial no Brasil, essas florestas têm sido estabelecidas com espécies do gênero *Eucalyptus*, cujos materiais genéticos apresentam alta produtividade e são adaptados a diferentes condições ambientais (ELDRIDGE et al., 1993).

A maioria das espécies de *Eucalyptus* é oriunda do continente australiano, existindo duas espécies endêmicas: de Nova Guiné (*E. deglupta*) e Timor (*E. urophylla*) (BROOKER e KLEINIG, 2004; LADIGES et al., 2003). Algumas espécies foram introduzidas em outros continentes onde têm desempenhado uma importância econômica relevante, devido ao fato de crescerem rapidamente e serem muito utilizadas para obtenção de diversos produtos (ELDRIDGE et al., 1993).

São reconhecidas mais de 900 espécies, subespécies, variedades e híbridos (BOLAND et al., 2006; BROOKER e KLEINIG, 2004; GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008). Em geral, são arbóreas com altura de 30 a 50 metros, no entanto, há espécies de porte mediano e algumas arbustivas (BROOKER e KLEINIG, 2004).

As primeiras introduções de espécies e procedências de eucalipto ocorreram no Brasil, logo nos primeiros anos do século XX, tendo os primeiros estudos sido iniciados por Edmundo Navarro de Andrade, na ex-Companhia Paulista de Estradas de Ferro, no estado de São Paulo, a partir de 1904. Assim, foi estimulado o plantio do eucalipto para fornecer, em menor tempo, combustível para a ferrovia e madeira para postes e dormentes (VENCOVSKY e RAMALHO, 2000; FERREIRA e SANTOS, 1997).

No Brasil, o gênero foi rapidamente difundido, principalmente nos estados de Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, devido às características vantajosas de alta adaptabilidade e crescimento rápido (GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008; GONÇALVES et al., 2013).

A área plantada de árvores no Brasil atingiu 7,6 milhões de hectares em 2013, sendo que o plantio de árvores de eucalipto representa 72% desse total, ou seja, 5,47 milhões de hectares e encontra-se em plena expansão (IBA, 2014). Um dos motivos dessa expansão é a elevada produtividade das florestas, resultante do esforço de equipes de pesquisa e operacionais de empresas, bem como de universidades e institutos de pesquisa ao longo dos

últimos anos. As maiores áreas com eucaliptos estão localizadas nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia e Mato Grosso do Sul. O estado de Minas Gerais liderou o plantio, seguido do estado de São Paulo. (ABRAF, 2013) (Figura 1).

O gênero possui uma ampla e diversificada utilização, sendo destinados à produção de papel e celulose, chapas de fibra, móveis, postes e mourões, lenha (energia), madeira para construção civil e óleos essenciais (WILCKEN et al., 2008).



Figura 1: Levantamento estatístico feito pela ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas), mostrando a expansão no plantio de eucalipto, por hectare, nos estados brasileiros, em 2013.

O setor florestal brasileiro, principalmente o ligado à eucaliptocultura, tem elevada importância econômica e social, este contribui com uma parcela importante na geração de produtos, tributos, empregos e bem-estar. O valor bruto da produção (VBP) do setor, em 2012, correspondeu à R\$ 56,3 bilhões, os tributos arrecadados totalizaram R\$ 7,6 bilhões (0,5% da arrecadação nacional) e sua participação no superávit da balança comercial nacional foi de 28,1% (ABRAF, 2013). Em 2012, as atividades da cadeia produtiva do setor contribuíram para a geração de 4,4 milhões de empregos diretos e indiretos, além do investimento de 149 milhões em programas de inclusão social, educação e meio ambiente (ABRAF, 2013).

Por sua larga empregabilidade econômica e rápido crescimento com idade média de corte de 6 a 8 anos, quando comparada ao ciclo das árvores de mata nativa que levam em média 25 anos, o eucalipto passou a ser uma alternativa racional contra a devastação das florestas nativas em diversas regiões do planeta, propiciando a preservação do meio ambiente (SCARPINELLA, 2002).

2.2 A genética e o melhoramento florestal

Em 1941, Navarro de Andrade convidou Carlos Arnaldo Krug, chefe da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), para, juntos, elaborarem um programa de melhoramento genético de eucaliptos. Esse programa foi considerado um dos mais avançados para sua época. Seus principais objetivos eram: a) melhorar a uniformidade das plantações; b) reduzir o número de falhas e o número de árvores dominadas das plantações; c) melhorar a forma do tronco, as características dos ramos, o crescimento em altura e diâmetro das árvores; d) melhorar a capacidade de brotação e e) aumentar a produção por unidade de área (FERREIRA e SANTOS, 1997). Contudo, maior impulso se deu a partir de 1960, isso devido aos incentivos fiscais que estimularam o plantio dessa cultura em diversas regiões do país e, em consequência, maior atenção foi dada ao melhoramento por parte do setor privado e público, o qual passou a ser realizado sistematicamente (VENCOVSKY e RAMALHO, 2000).

O sucesso de um programa de melhoramento depende da variabilidade da população a ser trabalhada. Melhoristas têm recomendado, para a formação de população-base, o inter cruzamento entre cultivares superiores e divergentes. Essa divergência pode ser avaliada

a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras, resultando informações múltiplas de cada cultivar, representando a diversidade existente no conjunto de acessos estudados (CRUZ e CARNEIRO, 2003).

Essas informações múltiplas são de grande importância em estudos de diversidade genética a qual tem sido avaliada com objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose, de tal forma que, em suas gerações segregantes, se tenha maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores, podendo resultar em híbridos superiores (CRUZ e REGAZZI, 1994).

A possibilidade de associação de características diferenciadas em espécies importantes, bem como a manifestação de heterose verificada nos cruzamentos entre vários pares de espécies têm levado os melhoristas de *Eucalyptus* a buscarem um meio mais rápido de promover o melhoramento de características florestais desejáveis (ASSIS et al., 1993).

As técnicas de melhoramento genético florestal vêm sendo utilizadas com o intuito de aumentar a produtividade, introduzir características desejáveis para o mercado, reduzir impactos ambientais e expandir a cultura em novos ambientes (GOLLE et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013; GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008). Os programas de melhoramento genético possuem dois aspectos fundamentais: a seleção dos genitores e os mecanismos de herança dos caracteres a serem selecionados. Ambos os aspectos requerem um conhecimento detalhado da constituição genética das espécies a fim de se obter, eficientemente, ganhos genéticos no melhoramento (BERED et al., 1997).

Em espécies florestais o melhoramento parte de uma população base ou experimental, que podem ter seu material genético recombinado em novos cruzamentos, onde serão realizadas seleções individuais ou de progênie (GOLLE et al., 2009; GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008). A maioria dos programas de melhoramento genético florestal, devido ao longo período necessário para que as plantas atinjam a maturidade reprodutiva, alcançaram apenas algumas gerações a partir da população original, sendo assim, considerados menos avançados quando comparados com os programas de melhoramento de outras culturas (GOLLE et al., 2009; GRATTAPAGLIA e KIRST, 2008).

Em eucalipto, a produção de linhagens puras, que é muito comum em culturas como a soja e o milho, é inviável em consequência do longo ciclo reprodutivo e reprodução alógama, havendo assim apenas indivíduos com a maioria dos locos em heterozigose (ZOBEL e TALBERT, 1984). O cruzamento entre plantas diferentes mantém o alto grau de variabilidade genética (heterozigose) na população (ZOBEL e TALBERT, 1984), no entanto, alguns cruzamentos podem demonstrar alterações fisiológicas e morfológicas (KLEKOWSKI JR,

1988; ZOBEL e TALBERT, 1984), podendo resultar em: não formação ou germinação de sementes; presença de plantas anormais, menores ou mais fracas que morrem prematuramente; e, raramente, plantas melhores (ZOBEL e TALBERT, 1984). Essas alterações podem ser decorrentes de efeitos negativos de alelos recessivos deletérios encobertos nos genitores heterozigotos (KLEKOWSKI JR, 1988), que resultam em consideráveis perdas e atrasos nos programas de melhoramento em andamento.

2.3 Genes deletérios e anomalias em eucalipto

Nas populações vegetais existem genes que reduzem a probabilidade de sobrevivência dos indivíduos que os carregam, os quais são denominados genes letais. No entanto, o grau de letalidade pode variar de moderado a completo. Muitos alelos recessivos deletérios permanecem ocultos em condições heterozigotas nas populações. Entretanto, o cruzamento entre indivíduos aparentados e a autofecundação podem reduzir a heterozigose e permitir que alelos recessivos de efeito desfavorável se manifestem em homozigose (LOURENÇÃO, 2010).

A identificação e caracterização de genes relacionados a doenças e anomalias são importantes para os programas de melhoramento florestal, tendo em vista as perdas causadas por esses genes na produção de mudas para plantios comerciais.

Nas populações vegetais os alelos deletérios podem ocasionar diversas formas de letalidade, desde plantas com anomalias brandas a anomalias severas, ocasionando a morte das plantas em um curto período de tempo. Poucos trabalhos são encontrados na literatura descrevendo anomalias em *Eucalyptus*. Maschio et al. (1996) relataram uma anomalia no crescimento de árvores de *Eucalyptus grandis*, em que as plantas apresentavam folhas secas e deformadas, entretanto, o trabalho apenas caracteriza os sintomas da anomalia. Estopa (2006) observou os descendentes das populações de clones e das populações híbridas, plantas com desenvolvimento anormal no campo na segregação de 15:1, provavelmente relacionado à presença de dois *loci* deletérios, com a manifestação do caráter em alelos recessivos para os dois genes. Porém, não foi identificada nenhuma marca morfológica ou molecular, que possibilitasse o reconhecimento precoce das plantas com anomalia.

2.4 Anatomia do Eucalipto

A principal parte da folha é a lâmina foliar, chamada de limbo foliar, nela a epiderme superior é conhecida como adaxial e a inferior como abaxial, e entre estas encontramos o mesofilo formado por parênquimas e tecidos condutores. O parênquima clorofiliano apresenta cloroplastos e tem a função de fotossíntese. Eles podem ser do tipo paliçádico em ambas as faces ou esponjoso em ambas, ou ainda paliçádico na adaxial e esponjoso na abaxial, este último conhecido como padrão dorsiventral é o tipo encontrado em *Eucalyptus*. O tecido condutor imerso no parênquima é composto pelo xilema e floema (MENDONÇA, 2010).

A epiderme é contínua e única em toda a extensão da folha, podendo variar o número de camadas que a formam (uni ou multisseriada) (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2012). Gomes et al (2009), afirmam que a lâmina foliar de eucalipto apresenta células epidérmicas uniestratificadas, além disso, cavidades secretoras distribuem-se ao longo de toda a extensão da lâmina foliar.

Em eucalipto, o parênquima paliçádico encontra-se imediatamente abaixo da epiderme. Suas células são alongadas, e em seção transversal da folha, tem forma de barras dispostas em fileiras, que podem ser iguais em comprimento ou se tornam menores à medida que se aproximam do centro. As células do tecido esponjoso variam muito na forma, podendo ser isodiamétricas ou alongadas em direção paralela à superfície da folha e muitas vezes apresentar espaços intercelulares (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Em estudos sobre anatomia de Myrtaceae, Gomes et al. (2009) observou que o parênquima paliçádico é composto por 1-2 camadas celulares, em alguns casos chegando a 3, e o parênquima esponjoso variando entre 6-8 camadas, exceto entre algumas espécies que varia de 3-5 camadas. Além de possuírem espaços intercelulares mais amplos.

A especialização do tecido paliçádico conduziu à eficiência da fotossíntese. No mesofilo claramente dorsiventral, ou seja, aquele que apresenta duas faces de aspecto diferente, uma ventral e outra dorsal, a grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à forma e ao arranjo das células do paliçádico, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes das células, maximizando a absorção de luz. Outro importante fator que aumenta a eficiência fotossintética é a ampliação de um sistema de espaços intercelulares no parênquima esponjoso, já que facilita as trocas gasosas. Devido ao arranjo das células do mesofilo, grandes superfícies das células ficam expostas e

entram em contato com o ar, presente nos espaços intercelulares (SALISBURY e ROSS, 2012).

Outro fator importante é a presença de estômatos, Tuffi Santos et al. (2006) relata ter encontrado uma quantidade menor de estômatos na superfície adaxial do que na abaxial em eucalipto. Esta característica está positivamente relacionada com a assimilação de CO₂ provavelmente com a relação positiva da densidade estomática com as trocas gasosas e com a maior condutância estomática (TUFFI SANTOS et al., 2006).

O pecíolo é a parte da folha que mais se aproxima, em estrutura, do caule que lhe deu origem. Da mesma maneira que no caule, observam-se no pecíolo, a epiderme, o córtex (constituído por parênquima e muitas vezes contendo cordões de colênquima e, esclerênquima) e o sistema vascular, cuja camada mais externa é o periciclo. A endoderme, camada mais interna do córtex, pode ter estrias de Caspary, estrias e amido, somente amido ou ser apenas constituídas de células parenquimáticas com ou sem substâncias fenólicas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Em secção transversal, o caule do *Eucalyptus grandis* é retangular, possuindo epiderme unisseriada, onde as células epidérmicas são papilosas recobertas por cutícula espessa (BRISOLA e DEMARCO, 2011). Internamente à epiderme encontra-se o córtex, que se origina do meristema fundamental. Na maioria das plantas, a região cortical é homogênea e composta apenas por tecido parenquimático fotossintetizante ou não. Em algumas espécies o córtex caulinar possui células especializadas secretoras de látex, mucilagem ou resina. Algumas células corticais podem ainda conter cristais de oxalato de cálcio ou depósitos de sílica (MENDONÇA, 2010).

Em *E. grandis*, o córtex possui grandes cavidades oleíferas, além da medula ser composta por parênquima fundamental e idioblastos contendo cristais prismáticos (BRISOLA e DEMARCO, 2011).

Mendonça (2010) ainda afirma que os feixes vasculares são formados por xilema e floema primários, e, em geral, o floema ocupa posição externa ao xilema, originando feixes colaterais. Em alguns caules, como nos de *Eucalyptus*, os feixes podem ser bicolaterais, com floema aparecendo externa e internamente ao xilema. Internamente ao sistema vascular, na região central do caule encontra-se a medula, que é formada por tecido parenquimático, podendo haver também células de esclerênquima.

A raiz é uma estrutura axial relativamente simples quando comparada ao caule e pode ser dividida anatomicamente em três sistemas de tecidos: a epiderme, em geral, é uniestratificada, onde algumas células sofrem expansão tubular e se diferenciam em pêlos

radiculares, aumentando a superfície de absorção; o sistema fundamental (região cortical ou córtex), constituído geralmente por células de parênquima e cuja camada mais interna é designada endoderme, enquanto a parte externa da região cortical pode designar-se de exoderme podendo apresentar várias camadas de células compactadas; e o cilindro vascular, que inclui o sistema vascular, apresentando uma camada exterior de células em geral parenquimatosas, que normalmente não apresentam cloroplastos, mas contém amido, formando o periciclo (camada celular que constitui a parte mais externa do cilindro central do caule e da raiz das plantas vasculares), tecidos vasculares (xilema e floema) e, nas raízes desenvolvidas, observa-se a medula zona central da raiz, preenchida por células parenquimatosas. Além de as células do córtex apresentar, geralmente, disposição radiada (MENDONÇA, 2010).

3 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi realizar caracterização morfoanatômicas de progênies segregantes para uma anomalia em mudas de *Eucalyptus grandis*, com aproximadamente quatro meses de idade. Avaliar os efeitos fenotípicos e morfológicos buscando caracterizar os padrões diferenciais nas plantas mutantes.

4 Material e Métodos

4.1 Material vegetal

Foi utilizado um total de 40 plantas jovens (20 normais e 20 anômalas), com aproximadamente quatro meses de idade, gentilmente cedidas pelo programa de melhoramento florestal da empresa Suzano Papel e Celulose, originadas a partir do cruzamento controlado dos indivíduos G07 e G26 de *Eucalyptus grandis*. Esses genitores não possuíam parentesco além de serem árvores matrizes utilizadas na produção de progênes destinadas a plantios comerciais.

4.1.1 Produção das mudas

Antes da semeadura o substrato recebeu adubação de base (Osmocote- NPK- 15-9-12) na dosagem 3kg/m^3 , e a mistura foi feita em betoneira própria para o fim.

A semente bruta (semente e palha) foi colocada para germinar em substrato de germinação (substrato Plantmax) em recipiente com capacidade de 57cm^3 em bandeja de 176 células. Após o semeio foi feita a cobertura das sementes com vermiculita fina (camada de 2 a 3 mm aproximadamente). A irrigação foi feita via barra de irrigação, e a quantidade de água e o tempo da irrigação foram feitos de forma visual de maneira com que permanecesse a umidade necessária para ocorrer a germinação adequada das sementes.

Posteriormente as sementes foram colocadas em casa de vegetação para a emergência e permaneceram por aproximadamente quatro meses, idade em que foram coletadas.

4.1.2 Coleta das mudas

Quando as mudas atingiram os quatro meses de idade foi realizada sua coleta no local onde elas se encontravam. Como a casa de vegetação se encontrava longe do local de trabalho, o material foi separado em folha, pecíolo, caule e raiz. As folhas foram limpas com álcool 70%, as raízes lavadas em água corrente e o caule cortado em pedaços menores, todos os materiais foram então envolvidos com papel laminado e fixados em nitrogênio líquido para serem levados ao laboratório.

Ao chegar ao laboratório, as amostras que seriam utilizadas tanto para a microscopia de luz quanto para a microscopia eletrônica de varredura foram separadas e as demais guardadas

em freezer -80°C para utilização futura.

4.2 Avaliações morfológicas

Para a análise morfológica, seis parâmetros foram avaliados, sendo eles: a) altura das plantas, medida do ápice até a base do caule com régua graduada (0,1 cm); b) diâmetro da base do caule, medido com paquímetro analógico, com precisão de 0,1 mm; c) área foliar, feita por microscopia de luz; d) formato do limbo foliar, por comparação e medição do comprimento e largura por régua graduada (0,1 cm); e) número de ramificações laterais do caule, de forma visual e; f) volume da raiz, por comparação e medição do comprimento por régua graduada (0,1 cm).

4.3 Microscopia de luz

Para a análise de microscopia de luz, foram utilizadas duas plantas de cada material, normal e anômalo. Os estudos anatômicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do IBB/UNESP.

Amostras de raiz, caule, pecíolo e limbo foliar, de cada planta normal e anômala, foram cortadas em pequenos pedaços e fixadas em FAA 50 (5 ml de formaldeído a 37%, 5 ml de ácido acético e 90 ml de álcool etílico a 50%) (JOHANSEN, 1940) por 24 horas. Este material foi então submetido à pré-infiltração e infiltração em resina sintética glicol metacrilato, o que lhes confere maior resistência e durabilidade, segundo métodos usuais, conforme protocolo a seguir:

- etanol 70% - 2 horas
- etanol 90% - 2 horas
- etanol 100% - 2 horas
- etanol 100% + resina líquida (1:1) – 2 horas
- resina ativada – mínimo de 12 horas em geladeira.

Após as amostras estarem emblocadas em resina, estas foram seccionadas em micrótomo rotativo semi-automático para obtenção de cortes de 5µm de espessura. Os cortes foram distendidos sobre as lâminas que continham uma gota de água, em seguida, as lâminas ficaram sobre uma placa aquecedora até que os cortes estivessem bem secos.

O material foi corado com azul de toluidina 0,05% em tampão acetato, ph 4,3 de

acordo com o protocolo de O'Brien, et al., (1964), no qual as lâminas foram colocadas em cubetas de vidro, próprias para coloração, foi adicionado o corante e aguardado 3 minutos, logo em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e secas em temperatura ambiente, e então as lâminas permanentes foram montadas utilizando Entelan como meio de montagem. O azul de toluidina cora as paredes celulósicas de roxo e as paredes lignificadas de azul esverdeado, mucilagens e paredes pécticas adquirem coloração rosa e compostos fenólicos coloração verde intensa.

O laminário foi analisado ao microscópio trinocular Olympus BX 41 e os resultados relevantes documentados com câmera digital acoplada. As análises morfométricas foram realizadas com auxílio do Programa Olympus Cell B.

4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura, foi utilizada uma planta de cada material, normal e anômalo. Os estudos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do IBB/UNESP.

Apenas amostras de folhas foram analisadas, estas foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 (ROBARDS, 1978). Após 24 horas em fixação primária, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0,1M, sendo em seguida destinados à fixação secundária em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato, por um período de 2 horas (ROBARDS, 1978). A seguir, o material foi submetido à desidratação em série etílica crescente, seguida de secagem em ponto crítico, com CO₂ como líquido de transição. As amostras foram coletadas em stubs de alumínio e metalizadas com ouro (ROBARDS, 1978). Foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Fei Quanta.

4.5 Metodologia estatística

Foi realizada a análise estatística de acordo com um modelo misto de classificações hierárquicas (SNEDECOR e COCHRAN, 1974) considerando como fixos os efeitos de materiais - normais e anômalos -, verificados pelo teste F da análise de variância. Os demais fatores, duas plantas de cada material, duas lâminas de cada planta, quatro cortes em cada lâmina e cinco determinações constituem a parte aleatória do modelo.

A homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste F-máximo para variâncias. As análises foram processadas no SAS (SAS Institute. 2012. The SAS System: Release 9.3.

SAS Institute, Cary, NC, USA.) e o nível de significância adotado foi de 5%.

5 Resultados e Discussão

5.1 Morfologia externa

Do cruzamento controlado de *Eucalyptus grandis* realizado pela empresa Suzano Papel e Celulose, as plantas anômalas apareceram na progênie em uma razão mendeliana de 3:1 (normais:anômalas) (TAMBARUSSI, 2006). De acordo com essa segregação mendeliana do fenótipo anômalo, Tambarussi (2006) e Lourenção (2010) sugeriram que a anomalia fosse controlada por um gene de efeito principal, com padrão de herança monogênica, apresentando alelos recessivos deletérios que, em homozigose, resultariam no caráter anômalo, e consequentemente na morte prematura das plantas.

O estudo dessa anomalia é caracterizado por um conjunto de alterações morfológicas, entre elas, a redução da altura da planta, a redução foliar e alterações na forma do limbo foliar, a presença de ramificações laterais e a redução do volume da raiz. A relação entre as características citadas com a anomalia sugere uma ação pleiotrópica do gene de efeito principal. Ramalho et al. (2004) denomina esse tipo de pleiotropia como sindrômica, pois há uma série de características que aparecem em conjunto e constitui uma síndrome, que no caso do estudo é a anomalia.

As plantas jovens de *Eucalyptus grandis* com quatro meses de idade apresentaram evidentes diferenças morfológicas entre o material considerado normal e o anômalo. As plantas normais apresentaram cerca de 24cm de comprimento do eixo vegetativo, enquanto que as anômalas mostraram 8,20cm (figuras 2A e 2B), ou seja, as plantas anômalas foram 3 vezes menores em altura que as plantas normais.

O número de ramificações do caule também variou entre os materiais. As plantas normais apresentaram caule não ramificado, já as plantas anômalas possuíam caule bastante ramificado (figura 2B).

As folhas de ambos os materiais são simples, pecioladas e peninérveas, com distribuição alterna. As plantas normais apresentaram limbo foliar com cerca de 5cm de comprimento e 1,5cm de largura na região mediana, formato elítico e contorno levemente sinuoso (figura 2C). O limbo foliar das plantas anômalas apresentou cerca de 3cm de comprimento e 0,3cm de largura na região mediana, além de contorno bastante irregular, estípulas desenvolvidas estavam associadas à base das folhas das plantas anômalas (figura 2D). Segundo White e Scott (2006), as características morfológicas das folhas podem afetar a

expansão total da copa e, conseqüentemente, a interceptação da radiação luminosa e a eficiência fotossintética da planta.

O sistema radicular nas plantas normais e anômalas é do tipo axial ou pivotante, apresentando cerca de 17-18cm de comprimento em ambos os casos. Nas plantas normais foram observadas raízes mais espessas e maior número de ramificações (figuras 2E e 2F).

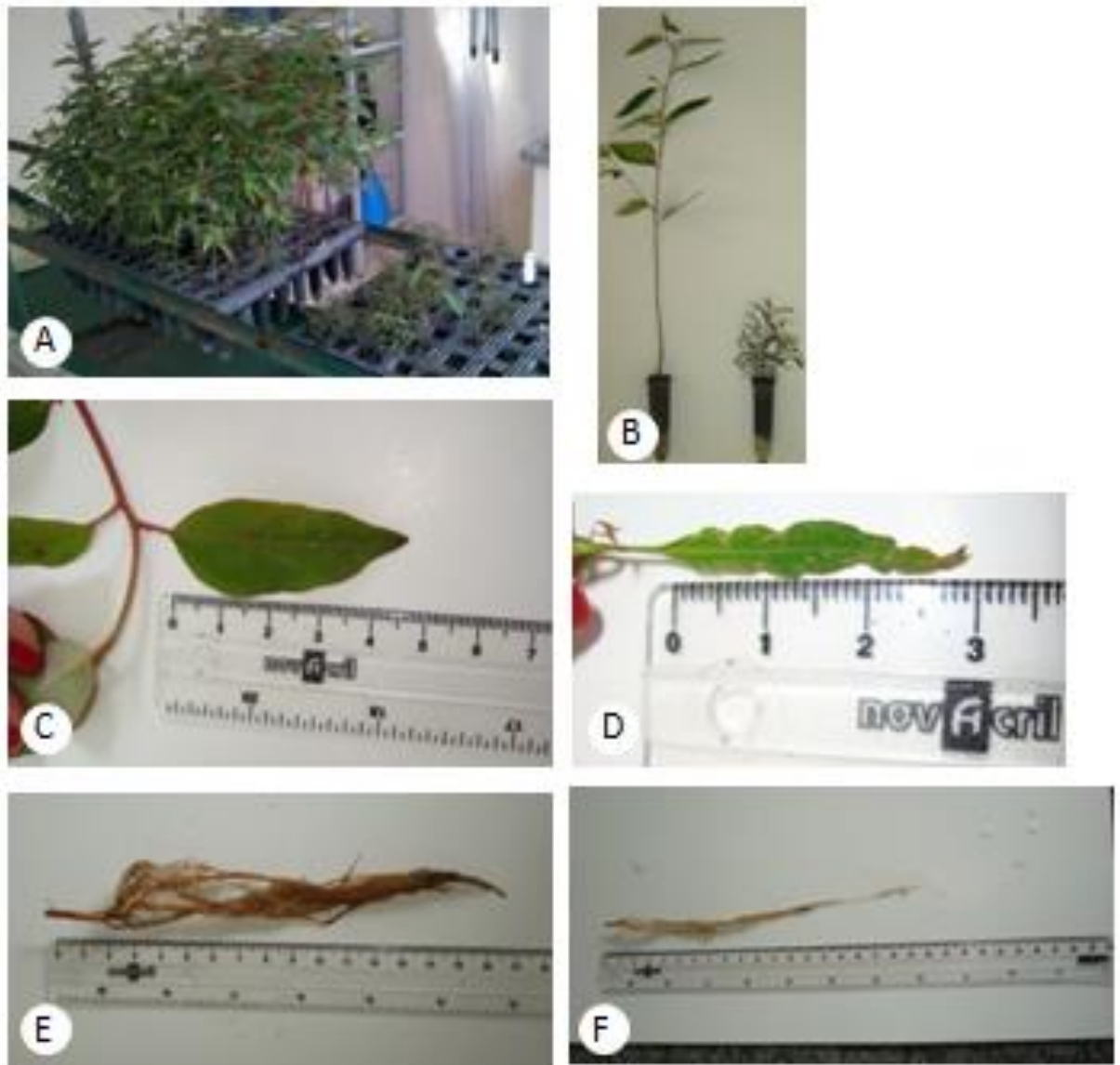


Figura 2: Aspectos da morfologia externa de plantas normais e anômalas de *Eucalyptus grandis*.

A, B. Plantas normais à esquerda e plantas anômalas à direita. C, D. Detalhe mostrando formato e contorno da folha normal à esquerda e anômala à direita. E, F. Sistema radicular de planta normal à esquerda e anômala à direita.

5.2 Micromorfologia foliar (MEV)

Em plantas normais e anômalas as folhas de eucalipto apresentaram limbo com intensa deposição de cera e estômatos em ambas as faces (figura 3). Nas plantas normais o número de estômatos encontrados na face abaxial do limbo foliar foi de 63, superior aos 37 encontrados nas folhas anômalas (tabela 1). No que se refere à deposição de cera, as imagens sugerem maior deposição na face adaxial do limbo foliar de plantas normais, enquanto que plantas anômalas apresentam maior deposição na face abaxial (figuras 3C e 3F). Já que a cera é uma deposição hidrofóbica sobre a superfície foliar que reduz a perda de água de tecidos para o meio externo, a maior deposição na face adaxial das plantas normais representa uma proteção maior para a perda de água, enquanto que nas plantas anômalas essa proteção está reduzida. Sem essa proteção, a transpiração da maioria das plantas terrestres seria tão rápida que elas morreriam. A capa protetora também oferece proteção contra alguns patógenos de plantas e contra pequenos danos mecânicos (SALISBURY e ROSS, 2012).

Tabela 1: Número de estômatos nas faces adaxial e abaxial do limbo foliar das plantas normais e anômalas através da análise micromorfológica.

LIMBO FOLIAR	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
Face adaxial	22	26
Face abaxial	63	37

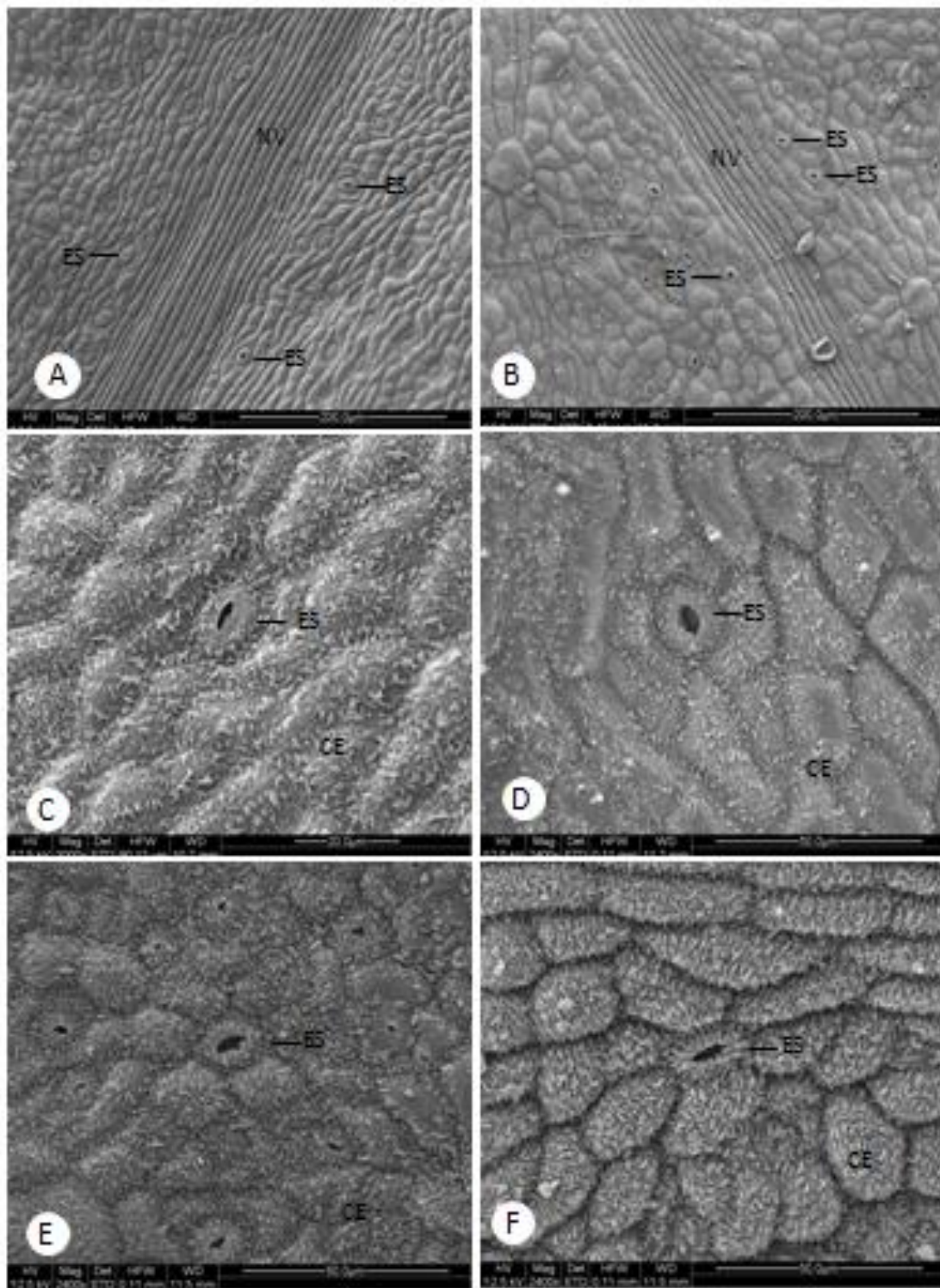


Figura 3: Eletromicrografias (MEV) da superfície do limbo foliar de plantas normais (A, C, E) e anômalas (B, D, F). A, B. Aspecto geral da face adaxial do limbo foliar. C, D. Detalhe da face adaxial do limbo foliar mostrando estômatos e deposição de cera epicuticular. E, F. Face abaxial do limbo foliar mostrando estômatos e deposição de cera epicuticular. CE: cera epicuticular; ES: estômato; NV: nervura

5.3 Análise anatômica

5.3.1 Limbo foliar

Em secção transversal, o limbo foliar de plantas anômalas e normais apresenta epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral constituído por uma camada de parênquima paliçádico e 4-5 camadas de parênquima esponjoso. Os feixes vasculares são colaterais com extensões da bainha do feixe. Cavidades secretoras de óleo ocorrem no mesofilo de ambos os materiais (figuras 4A e 4B). Na região da nervura principal observa-se córtex constituído por 2-3 camadas de colênquima e 4-5 camadas de parênquima; células contendo drusas de oxalato de cálcio foram observadas no parênquima cortical e no floema (figuras 4C e 4D).

As folhas das plantas normais apresentam maior largura do limbo foliar, sendo de 6817,57 μm , representado pela distância entre nervura principal e bordo, em comparação com 3253,72 μm da planta anômala, além de maior espessura de parênquima esponjoso, com uma média de 98,35 μm , enquanto que as plantas anômalas apresentaram uma média de 76,84 μm , e maior número de cavidades secretoras de óleo, sendo 11 na normal e 7 na anômala (figuras 4A e 4B, tabela 2). Nas plantas normais as cavidades de óleo são mais volumosas. Os óleos essenciais apresentam reconhecidas propriedades como repelentes de insetos e patógenos, repelindo potenciais herbívoros, mesmo antes que ataquem as plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013). As folhas das plantas anômalas também apresentam menor área de parênquima paliçádico, que está associado com a captação de luz, sendo a média de 58,30 μm contra 67,20 μm das plantas normais, e maior quantidade de espaços intercelulares, apesar da média de espaços intercelulares numa área específica da folha da planta anômala ser menor que da planta normal (figura 4F).

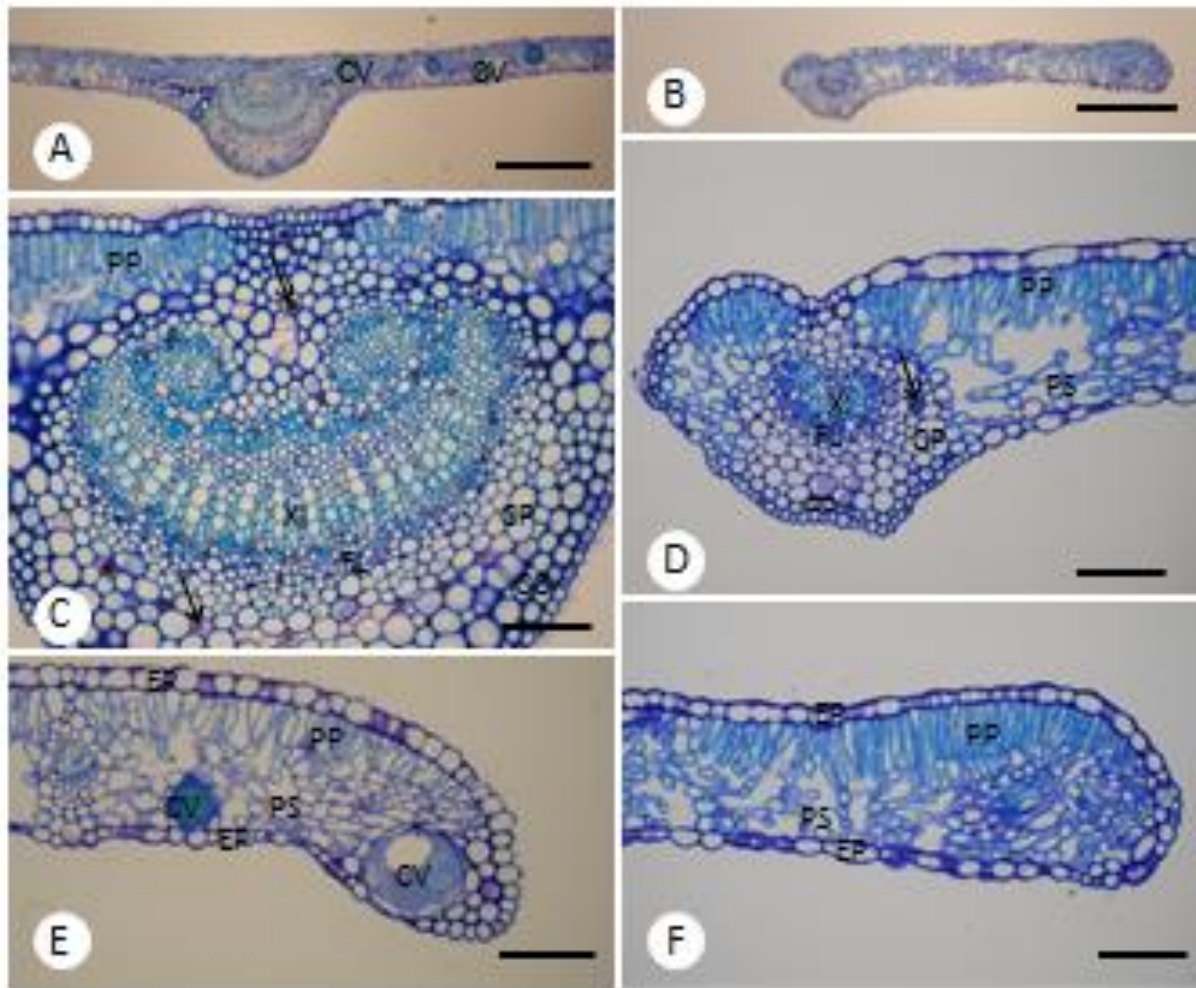


Figura 4: Fotomicrografias do limbo foliar de plantas normais (A, C, E) e anômalas (B, D, F) de *Eucalyptus grandis* em secções transversais. A, B. Aspecto geral mostrando o tamanho do limbo foliar. C, D. Detalhe mostrando epiderme unisseriada, formato do cilindro vascular e cristais de oxalato de cálcio. E, F. Detalhe mostrando parênquima paliçádico e parênquima esponjoso. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio. CV: cavidade de óleo; PP: parênquima paliçádico; PS: parênquima esponjoso; XI: xilema; FL: floema; EP: epiderme; CP: células parenquimáticas; CO: células de colênquima. Barras de: A e B= 500 μ m; C, D, E, F= 100 μ m.

Tabela 2: Análise morfológica do limbo foliar em secções transversais de plantas normais e anômalas de *Eucalyptus grandis*.

LIMBO FOLIAR	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
Largura (Nervura central – bordo)	6817,57 μm	3253,72 μm
Altura	170,12 μm	162,57 μm
Espessura da epiderme – face adaxial	16,48 μm	16,47 μm
Espessura da epiderme – face abaxial	13,31 μm	13,48 μm
Número de camadas do parênquima paliçádico	1	1
Número de camadas do parênquima esponjoso	4	4
Área dos espaços intercelulares	M= 6857,61 μm^2	M= 3886,49 μm^2
Espessura do parênquima paliçádico	M=67,20 μm	M=58,30 μm
Espessura do parênquima esponjoso	M=98,35 μm	M=76,84 μm
Número de cavidades de óleo por corte transversal	11	7
Área do Lúmen das cavidades de óleo	M=5628,90 μm^2	M=3587,00 μm^2
Altura da nervura central	589,21 μm	293,05 μm
Diâmetro dos elementos de vasos da nervura central	M=16,20 μm	M=8,83 μm
Área ocupada pelo sistema vascular na nervura principal	87663,78 μm^2	14394,45 μm^2

A região da nervura principal apresenta-se mais desenvolvida nas plantas normais, onde se observa maior área ocupada pelos tecidos vasculares, sendo de $87663,78\mu\text{m}^2$, enquanto que nas anômalas a área foi de $14394,45\mu\text{m}^2$, e elementos de vaso com maior diâmetro, onde calculamos uma média de $16,20\mu\text{m}$ nas normais e $8,83\mu\text{m}$ nas anômalas (tabela 2).

Maior abundância de cristais de cálcio foi observada nas folhas de plantas normais (figura 4C). Os cristais são formados pela mobilização de excesso de cálcio, que indica proteção contra herbivoria (TAIZ E ZEIGER, 2013).

Verifica-se pela Tabela 3 que houve diferença significativa de 1% na variável área dos espaços intercelulares (AEI) e diferença ao nível de 5% para diâmetro dos elementos de vasos (DEV), para as demais variáveis, espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima esponjoso (EPE) e área do lúmen (AL) (Tabela 4), não houve diferença significativa.

O coeficiente de variação que variou de 19,72 para o diâmetro dos elementos de vasos (Tabela 3) a 73,80 para a área do lúmen (Tabela 4).

Tabela 3. Quadrados médios da análise de variância para as variáveis do limbo foliar: área dos espaços intercelulares, espessura do parênquima paliçádico, espessura do parênquima esponjoso e diâmetro dos elementos de vasos.

VARIÁVEIS					
F.V.	GL	AEI	EPP	EPE	DEV
Material	1	353102519**	3171,33 ^{ns}	18510,00 ^{ns}	2171,05*
Resíduo	158	6883302	167,25	374,62	6,09
Média		5372,05	62,75	87,59	12,51
CV (%)		48,83	20,60	22,09	19,72

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em % (CV), área dos espaços intercelulares em μm^2 (AEI), espessura do parênquima paliçádico em μm (EPP), espessura do parênquima esponjoso em μm^2 (EPE), diâmetro dos elementos de vasos em μm (DEV). ^{ns}, ** e * - não significativo, significativo a 1% e 5% pelo teste F, respectivamente.

Tabela 4. Quadrado médio da análise de variância para a variável do limbo foliar: área do lúmen.

F.V.	GL	AL
Material	1	89286197 ^{ns}
Resíduo	92	13144099
Média		4912,06
CV (%)		73,80

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em % (CV), área do lúmen em μm^2 (AL). ^{ns} - não significativo.

Observa-se que no limbo foliar, os valores das médias das plantas normais nas variáveis, área dos espaços intercelulares (AEI), diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen foi praticamente o dobro do valor das médias das plantas anômalas. Em relação à espessura do parênquima paliçádico (EPP) e espessura do parênquima esponjoso (EPE), os valores das médias das plantas anômalas foram mais próximos aos das plantas normais (Tabela 5).

O parênquima paliçádico entre as plantas normais e anômalas além de não apresentar diferença significativa pelo teste F foi também o que apresentou menor diferença entre os valores de médias. Essa variável está intimamente relacionada com a fotossíntese e, um maior desenvolvimento desse tecido pode permitir maior fixação de CO₂ com uma abertura dos estômatos em curto espaço de tempo (CASTRO et al., 2009). De acordo com Silva et al., (2005) quanto mais espessa a cutícula e mais compacto o parênquima paliçádico, mais resistente é a planta aos patógenos; porém o parênquima compacto pode interferir na distribuição de carbono acarretando menor eficiência fotossintética.

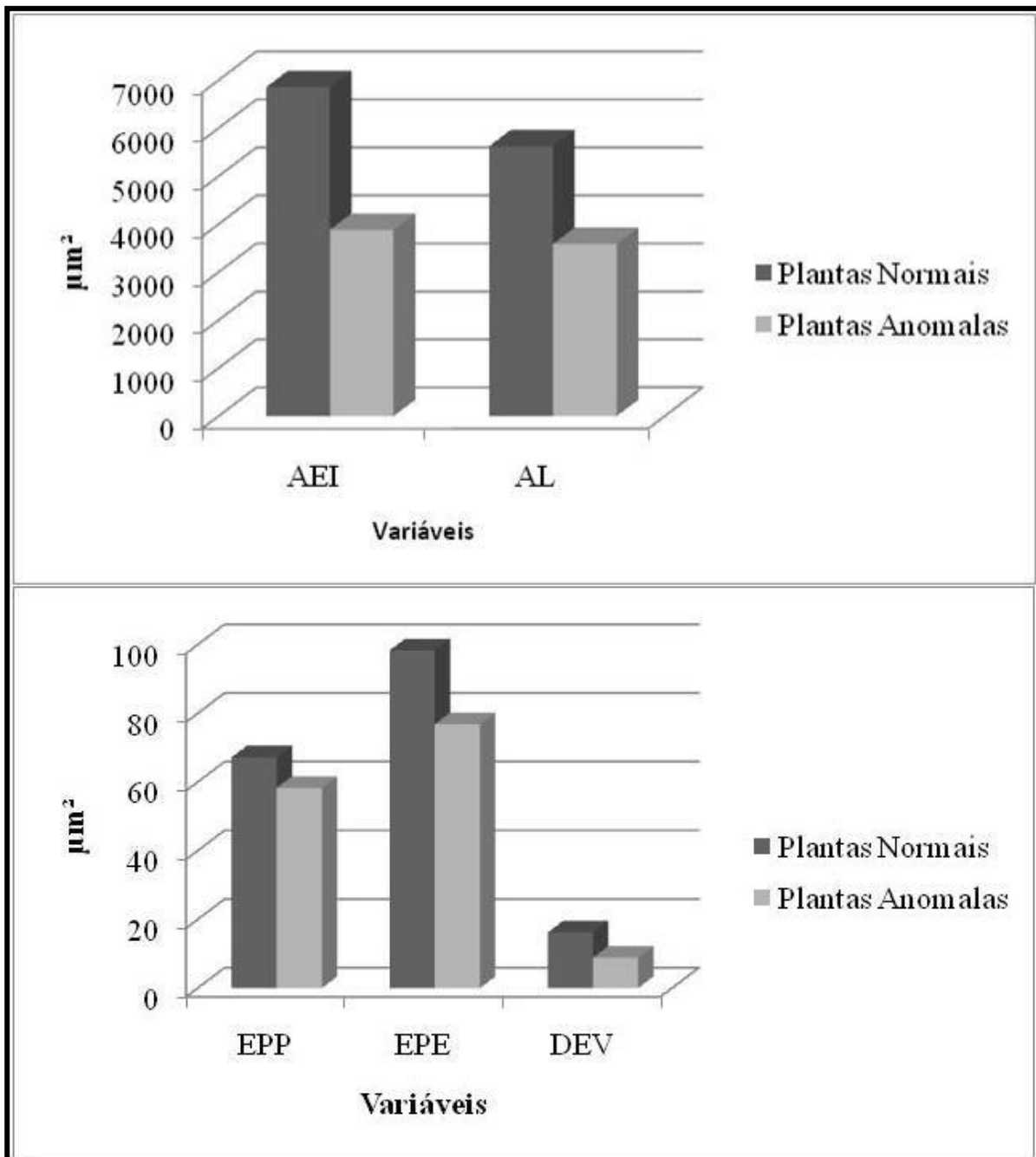
Tabela 5. Quadro de médias das variáveis do limbo foliar: área dos espaços intercelulares, espessura do parênquima paliçádico, espessura do parênquima esponjoso, diâmetro dos elementos de vasos e área do lúmen.

VARIÁVEIS	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
AEI	6857,61	3886,49
EPP	67,20	58,30
EPE	98,35	76,84
DEV	16,20	8,83
AL	5628,90	3587,00

Área dos espaços intercelulares (AEI), espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima esponjoso (EPE), diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

Para uma melhor análise e visualização, uma representação esquemática foi feita mostrando a grande diferença entre as médias das variáveis: área dos espaços intercelulares (AEI), área do lúmen (AL) e diâmetro dos elementos de vasos (DEV), e uma menor diferença entre as variáveis: espessura do parênquima paliçádico (EPP) e espessura do parênquima esponjoso (EP) das plantas normais e anômalas (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática da média das variáveis do limbo foliar.



Área dos espaços intercelulares (AEI), área do lúmen (AL), espessura do parênquima paliçádico (EPP), espessura do parênquima esponjoso (EPE), diâmetro dos elementos de vasos (DEV).

5.3.2 Pecíolo

O pecíolo das plantas normais apresenta formato côncavo na face adaxial e convexo na face abaxial, além de mostrar maior área total, sendo de $508254,55\mu\text{m}^2$. Nas plantas

anômalas o pecíolo apresenta formato côncavo na face adaxial e convexo na face abaxial, além de projeções laterais e menor área total de apenas 133017,97 μm^2 (figuras 6A e 6B).

Em secções transversais de plantas normais e anômalas o pecíolo apresenta epiderme unisseriada, córtex constituído por parênquima e colênquima e sistema vascular central. Cavidades de óleo ocorrem no córtex de ambos os materiais (figuras 6A e 6B). No córtex das plantas anômalas, além de parênquima de preenchimento ocorrem células parenquimáticas em paliçada na face superior do pecíolo (figura 6D), podendo indicar um maior “esforço” para manter taxas fotossintéticas.

Nas plantas normais, o pecíolo apresenta maior área cortical, 420614,77 μm^2 , em comparação com 113925,73 μm^2 das plantas anômalas, maior número de camadas colenquimáticas (maior sustentação), sendo quatro, enquanto que as anômalas apresentaram 1-2 camadas, nas plantas normais o sistema vascular é mais desenvolvido e os elementos de vaso são maiores, indicando um transporte mais eficiente, sendo a média de 16,90 μm e nas anômalas média de 8,28 μm (tabela 6). Além disso, observa-se maior abundância de cristais de cálcio no córtex (figuras 6C e 6E).

Tabela 6: Análise morfométrica do pecíolo em secções transversais de plantas normais e anômalas de *Eucalyptus grandis*.

PECÍOLO	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
Área Total	508254,55 μm^2	133017,97 μm^2
Espessura da epiderme	16,33 μm	15,69 μm
Área do córtex	420614,77 μm^2	113925,73 μm^2
Número de camadas do colênquima	4	1-2
Número de camadas do parênquima	4-5	3-4
Área do sistema vascular	87639,78 μm^2	13311,37 μm^2
Numero de cavidades de óleo	5	4
Área do lúmen das cavidades de óleo	M=9231,78 μm^2	M=4537,53 μm^2
Diâmetro dos elementos de vasos	M=16,90 μm	M=8,28 μm

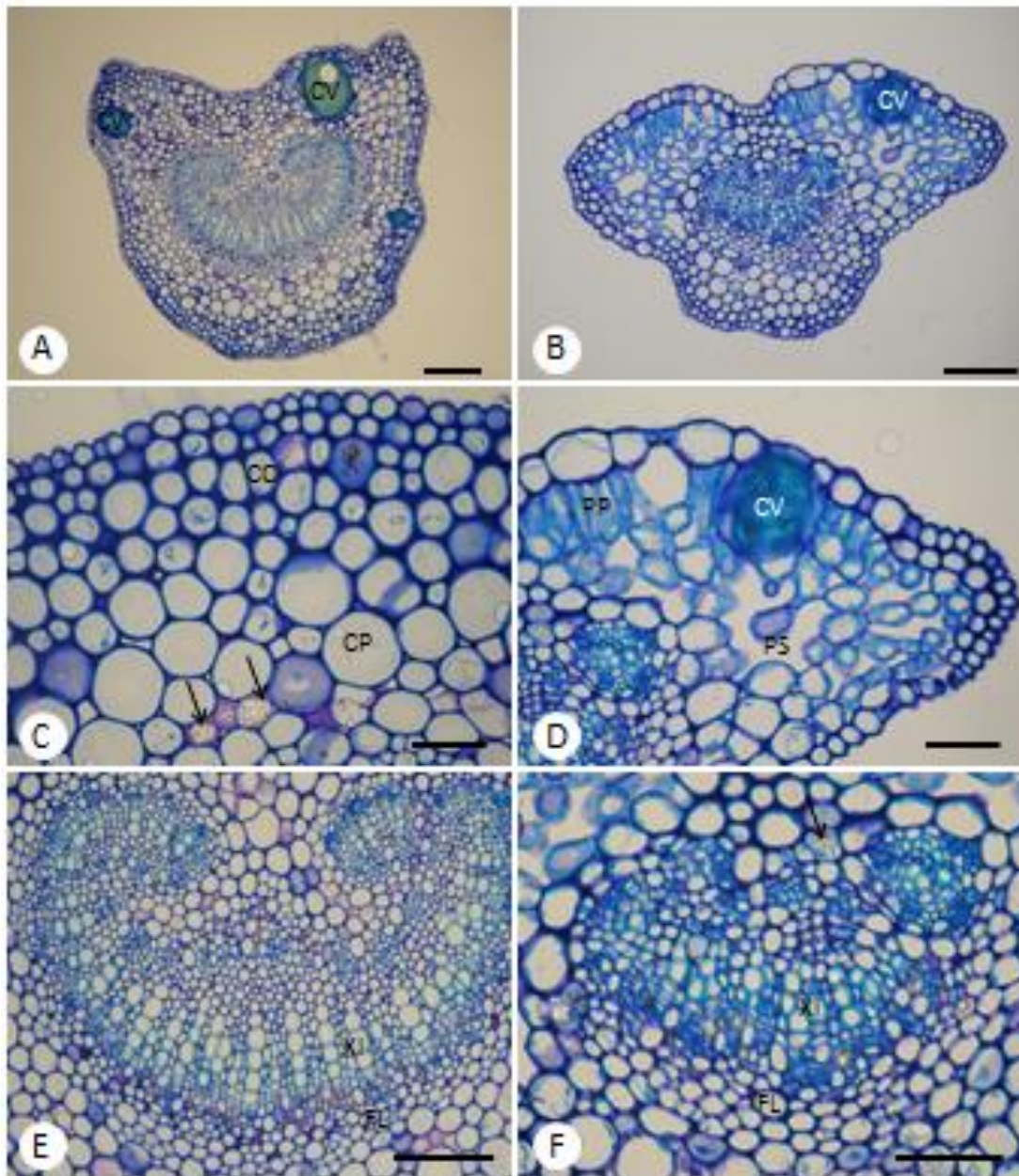


Figura 6: Fotomicrografias do pecíolo de plantas normais (A, C, E) e anômalas (B, D, F) de *Eucalyptus grandis* em secções transversais. A, B. Aspecto geral mostrando o formato. C, D. Detalhe da epiderme unisseriada. D. Detalhe mostrando presença de células parenquimáticas em paliçadas na planta anômala. E, F. Sistema vascular mais desenvolvido nas plantas normais e menos desenvolvido nas plantas anômalas. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio. CV: cavidade de óleo; PP: parênquima paliçádico; PS: parênquima esponjoso; XI: xilema; FL: floema; CP: células parenquimáticas; CO: células de colênquima. Barras de: A= 150µm; B e E= 100µm; C, D, F= 50µm.

Para as duas variáveis analisadas do pecíolo houve diferenças significativas pelo teste F, sendo ao nível de 5% para o diâmetro dos elementos de vasos, com CV de 17,70 (Tabela 7) e para a área do lúmen (AL), diferença de 1% e CV de 51,37 (Tabela 8).

Tabela 7. Quadrado médio da análise de variância para a variável do pecíolo: diâmetro dos elementos de vasos.

F.V.	GL	DEV
Material	1	2968,55*
Resíduo	158	4,97
Média		12,59
CV (%)		17,70

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em %(CV), diâmetro dos elementos de vasos em μm (DEV). * - significativo a 5% pelo teste F.

Tabela 8. Quadrado médio da análise de variância para a variável do pecíolo: área do lúmen.

F.V.	GL	AL
Material	1	281529158**
Resíduo	56	15627597
Média		7694,01
CV (%)		51,37

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em %(CV), área do lúmen em μm^2 (AL). ** - significativo a 1% pelo teste F.

O quadro de médias relacionado às variáveis estudadas do pecíolo mostrou, que tanto para o diâmetro dos elementos de vasos (DEV) quanto para a área do lúmen, os valores das médias das plantas normais foram o dobro do valor das médias das plantas anômalas (Tabela 9).

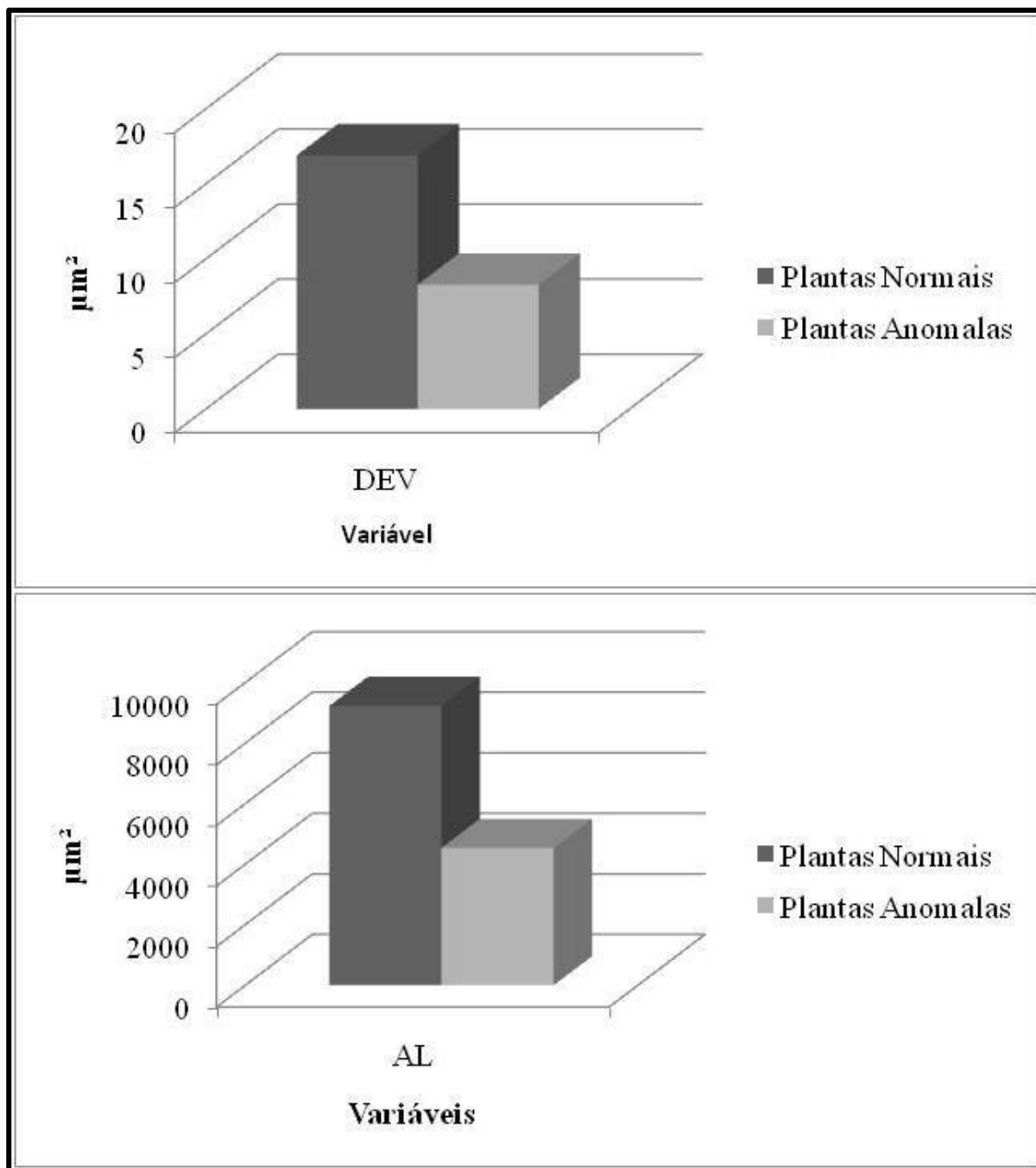
Tabela 9. Quadro de médias das variáveis do pecíolo: diâmetro dos elementos de vasos e área do lúmen.

VARIÁVEIS	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
DEV	16,90	8,28
AL	9231,78	4537,53

Diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

Na Figura 7 temos a representação esquemática onde se observa a grande diferença entre as médias das variáveis estudadas: diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

Figura 7: Representação esquemática da média das variáveis do pecíolo.



Diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

5.3.3 Caule

O caule das plantas normais, em seção transversal, apresenta formato retangular (figura 8A) e uma maior área total, $7965648,63\mu\text{m}^2$ (tabela 10). Nas plantas anômalas, o caule apresenta formato ligeiramente arredondado com projeções laterais e menor área total de $203740,5\mu\text{m}^2$ (figura 8B).

Nas plantas normais e anômalas, o caule apresenta epiderme unisseriada, córtex constituído por parênquima e colênquima, sistema vascular desenvolvido e medula parenquimática central. Cavidades de óleo ocorrem no córtex de ambos os materiais, sendo mais abundantes nas plantas normais (figuras 8C e 8D, tabela 10). Observa-se também grande quantidade de cristais de cálcio no córtex e na medula de ambos os materiais (figuras 8E e 8F).

Nas plantas normais, o caule apresenta maior área cortical, $4140603,75\mu\text{m}^2$, sendo de $119351,24\mu\text{m}^2$ nas plantas anômalas, maior número de camadas colenquimáticas, sistema vascular mais desenvolvido e organizado, zona cambial mais distinta e elementos de vaso com maior diâmetro, sendo a média de $16,79\mu\text{m}$, enquanto que nas plantas anômalas, a média do diâmetro dos elementos de vasos foi $9,99\mu\text{m}$ (tabela 10). Nas plantas anômalas, os elementos vasculares são menos desenvolvidos e com aspecto colapsado, principalmente no floema, levando a um transporte deficiente de substâncias, prejudicando o desenvolvimento geral da planta.

Tabela 10: Análise morfométrica do caule em secções transversais de plantas normais e anômalas de *Eucalyptus grandis*.

CAULE	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
Área Total	$7965648,63\mu\text{m}^2$	$203740,50\mu\text{m}^2$
Espessura da epiderme	$12,68\mu\text{m}$	$13,73\mu\text{m}$
Área do córtex	$4140603,75\mu\text{m}^2$	$119351,24\mu\text{m}^2$
Número de camadas do colênquima	2-3	1
Número de camadas do parênquima	4-5	4
Área do sistema vascular	$2320625,73\mu\text{m}^2$	$53773,40\mu\text{m}^2$
Área da medula	$1504419,15\mu\text{m}^2$	$30615,86\mu\text{m}^2$
Número de cavidades de óleo por secção transversal	9	2
Área do lúmen das cavidades de óleo	$M=4211,33\mu\text{m}^2$	$M=2678,14\mu\text{m}^2$
Diâmetro dos elementos de vasos	$M=16,79\mu\text{m}$	$M=9,99\mu\text{m}$

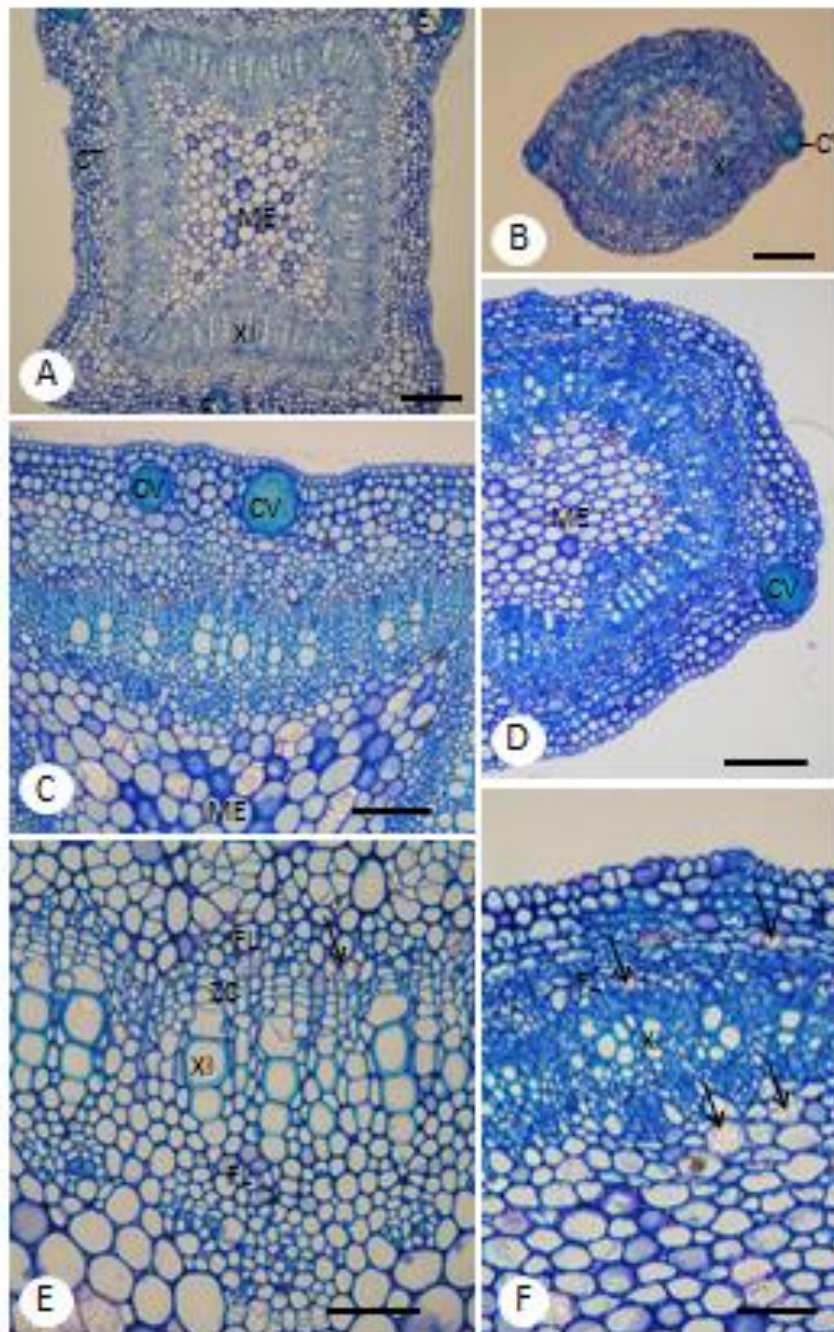


Figura 8: Fotomicrografias do caule de plantas normais (A, C, E) e anômalas (B, D, F) de *Eucalyptus grandis* em seções transversais. A, B. Aspecto geral mostrando o formato do caule. C, D. Detalhe mostrando epiderme unisseriada, córtex e cilindro vascular. E, F. Detalhe mostrando xilema e floema. Notar aspecto colapsado do floema e maior desorganização do xilema em F. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio. CT: córtex; CV: cavidade de óleo; XI: xilema; FL: floema; ME: medula; ZC: zona cambial. Barras de: A e B= 150 μ m; C e D= 100 μ m; E e F= 50 μ m.

A análise estatística para o caule mostra na Tabela 11 que para a variável diâmetro dos elementos de vasos (DEV), houve diferenças significativas pelo teste F, ao nível de 1%, uma vez que pela comparação da análise anatômica, o caule das plantas anômalas se encontram totalmente colapsados, impedindo a expansão celular e conseqüentemente o crescimento em altura da planta.

Em relação à área do lúmen (Tabela 12), a diferença significativa entre as plantas normais e anômalas foi de 5% pelo teste F. De acordo com Brisola e Demarco (2011), em *E. grandis*, o córtex é constituído por cavidades oleíferas grandes, essa é uma característica importante para a defesa contra alguns tipos de patógenos nas plantações. Análise anatômica de folhas de *E. grandis* mostrou que os indivíduos que possuem maior número e área de cavidades oleíferas, conseqüentemente produzindo mais óleo, são os mais resistentes contra a ferrugem-do-eucalipto (SOUZA, 2008).

Tabela 11. Quadrado médio da análise de variância para a variável do caule: diâmetro dos elementos de vasos.

F.V.	GL	DEV
Material	1	1847,62**
Resíduo	158	9,83
Média		13,39
CV (%)		23,41

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em %(CV), diâmetro dos elementos de vasos em μm (DEV). ** - significativo 1% pelo teste F.

Tabela 12. Quadrado médio da análise de variância para a variável do caule: área do lúmen.

F.V.	GL	AL
Material	1	58672817,70*
Resíduo	98	3962431,80
Média		3414,07
CV (%)		58,30

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em %(CV), área do lúmen em μm^2 (AL). * - significativo a 5% pelo teste F.

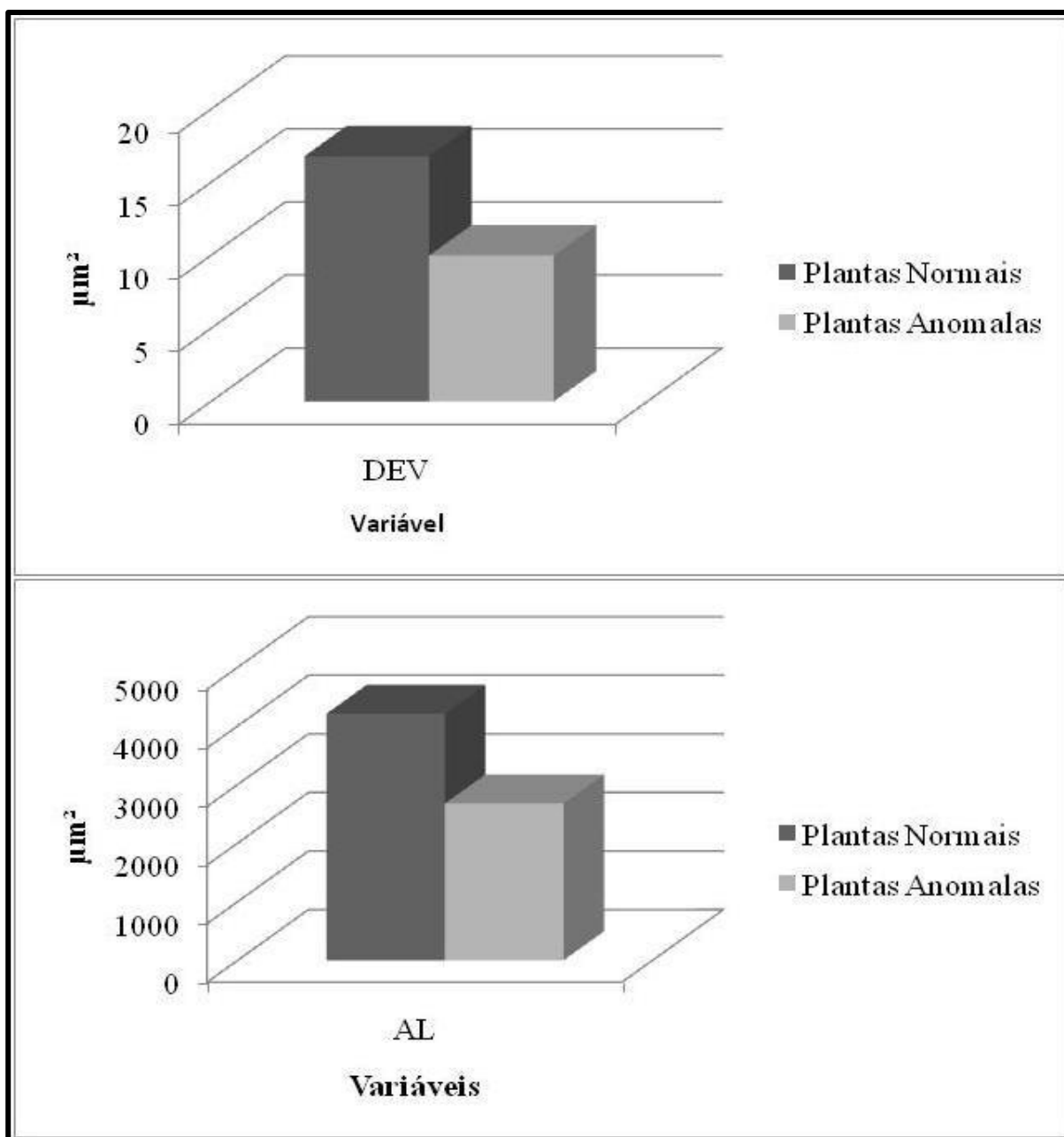
Para as variáveis do caule analisadas, o quadro de médias mostrou que os valores das médias tanto para o diâmetro dos elementos de vasos (DEV) quanto para a área do lúmen, das plantas anômalas, estão próximos da metade dos valores de média das plantas normais (Tabela 13).

Tabela 13. Quadro de médias das variáveis do caule: diâmetro dos elementos de vasos e área do lúmen.

VARIÁVEIS	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
DEV	16,79	9,99
AL	4211,33	2678,14

Diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

A representação esquemática das médias das variáveis: diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL) do caule podem ser observadas na Figura 9.

Figura 9: Representação esquemática da média das variáveis do caule.

Diâmetro dos elementos de vasos (DEV) e área do lúmen (AL).

5.3.4 Raiz

As secções transversais das raízes das plantas normais e anômalas apresentam formato arredondado (figuras 10A e 10B), sendo que plantas normais possuem raízes com maior diâmetro (tabela 14). As amostras mostraram-se em crescimento secundário em ambos os materiais, sendo observados, floema secundário, zona cambial ampla e, xilema secundário (figuras 10E e 10F). Idioblastos de compostos fenólicos e idioblastos cristalíferos foram observados no floema de ambos os materiais. A presença de compostos fenólicos em órgãos totalmente diferenciados está relacionada com os mecanismos de interação entre plantas e animais, agindo como dissuasivo alimentar e reduzindo a herbivoria (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Nas plantas normais, as raízes apresentaram zona cambial mais ampla, sendo a média de 14,81 μm e nas anômalas, média de 14,74 μm ; xilema e floema mais desenvolvidos; fibras com paredes mais espessas, e raios mais evidentes. As plantas anômalas apresentaram maior densidade de elementos de vasos, sendo 16/21031,62 μm^2 , elementos de vasos com maior diâmetro, e raios menos evidentes (tabela 14). Dos órgãos estudados, a raiz foi o que apresentou a menor diferença entre os materiais.

Tabela14: Análise morfométrica do caule em secções transversais de plantas normais e anômalas de *Eucalyptus grandis*.

RAIZ	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
Área Total	16568655,09 μm^2	316705,55 μm^2
Diâmetro dos elementos de vasos	M=27,28 μm	M=25,41 μm
Altura da zona cambial	M=14,81 μm	M=14,74 μm
Número de elementos de vasos por área do xilema (densidade de elementos de vaso)	15/38369,00 μm^2	16/21031,62 μm^2
Área ocupada pelo floema secundário	162902,03 μm^2	118216,17 μm^2
Área ocupada pelo xilema secundário	258688,25 μm^2	100685,35 μm^2
Espessura das paredes das fibras	M=4,03 μm	M=4,15 μm
Largura das fibras	M=8,27 μm	M=8,09 μm

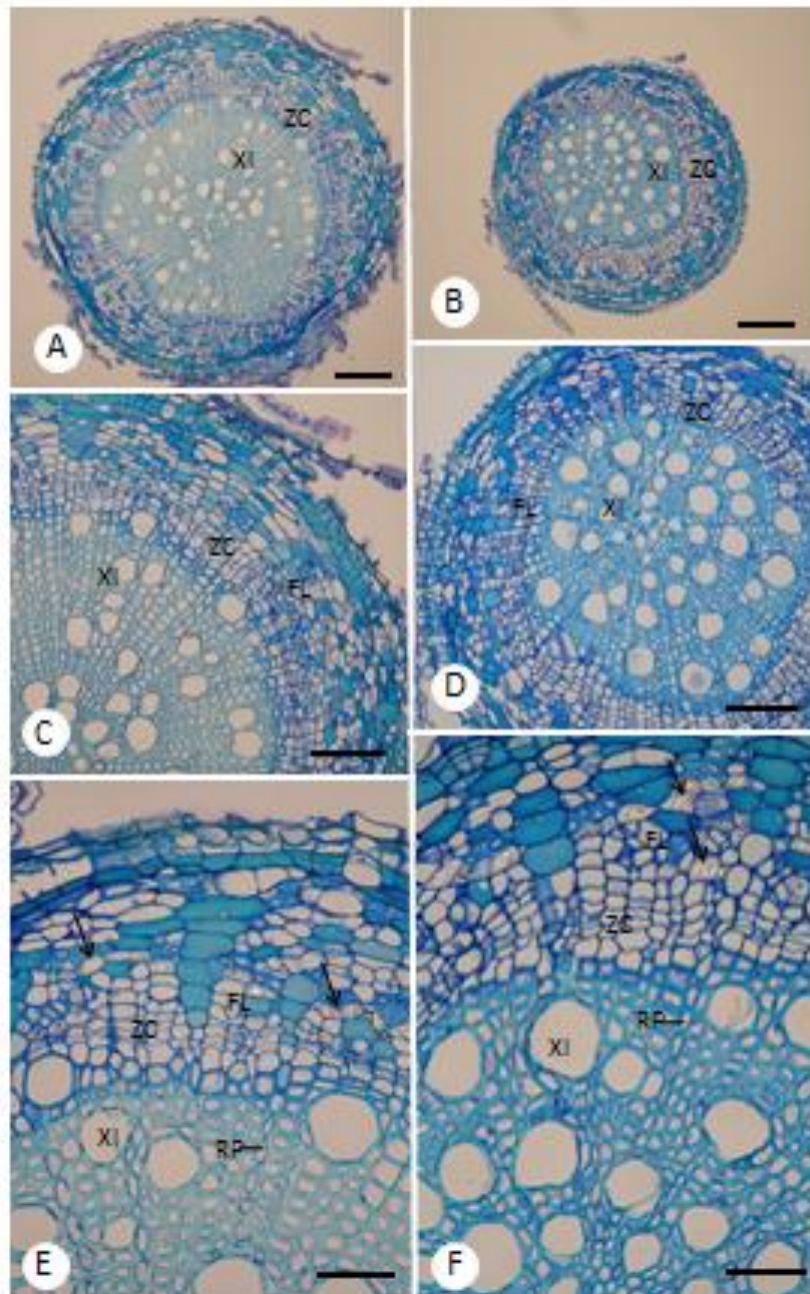


Figura 10: Fotomicrografias da raiz de plantas normais (A, C, E) e anômalas (B, D, F) de *Eucalyptus grandis* em secções transversais. A, B. Aspecto geral mostrando o formato. C, D. Detalhe mostrando xilema, floema e zona cambial. Em C, notar raios parenquimáticos mais evidentes nas plantas normais. Em F, notar elementos de vasos com maior diâmetro e maior densidade de elementos de vasos nas plantas anômalas. As setas indicam cristais de oxalato de cálcio. XI: xilema; FL: floema; ZC: zona cambial; RP: raios parenquimáticos. Barras de: A e B= 150 μ m; C e D= 100 μ m; E e F= 50 μ m.

Na Tabela 15 verifica-se que nenhuma variável apresentou diferença significativa de acordo com o teste F, e o coeficiente de variação experimental (CV%) variou de 23,64 em relação a espessura das paredes das fibras (EPF) a 36,74 do diâmetro dos elementos de vasos (DEV).

Tabela 15. Quadrados médios da análise de variância para as variáveis da raiz: diâmetro dos elementos de vasos, altura da zona cambial, espessura das paredes das fibras, largura das fibras.

VARIÁVEIS					
F.V.	GL	DEV	AZC	EPF	LF
Material	1	140,49 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,63 ^{ns}	1,30 ^{ns}
Resíduo	158	93,73	22,80	0,93	4,32
Média		26,34	14,78	4,09	8,18
CV (%)		36,74	32,31	23,64	25,39

Fonte de variação (FV), grau de liberdade (GL), coeficiente de variação em %(CV), diâmetro dos elementos de vasos em μm (DEV), altura da zona cambial em μm (AZC), espessura das paredes das fibras em μm (EPF), largura das fibras em μm (LF). ^{ns} - não significativo pelo teste F.

O quadro de médias para as variáveis da raiz analisadas mostra que não houve diferença entre as médias das plantas normais e plantas anômalas para todas as variáveis estudadas: diâmetro dos elementos de vasos (DEV), altura da zona cambial (AZC), espessura das paredes das fibras (EPF) e largura das fibras (LF), como podemos observar na Tabela 16.

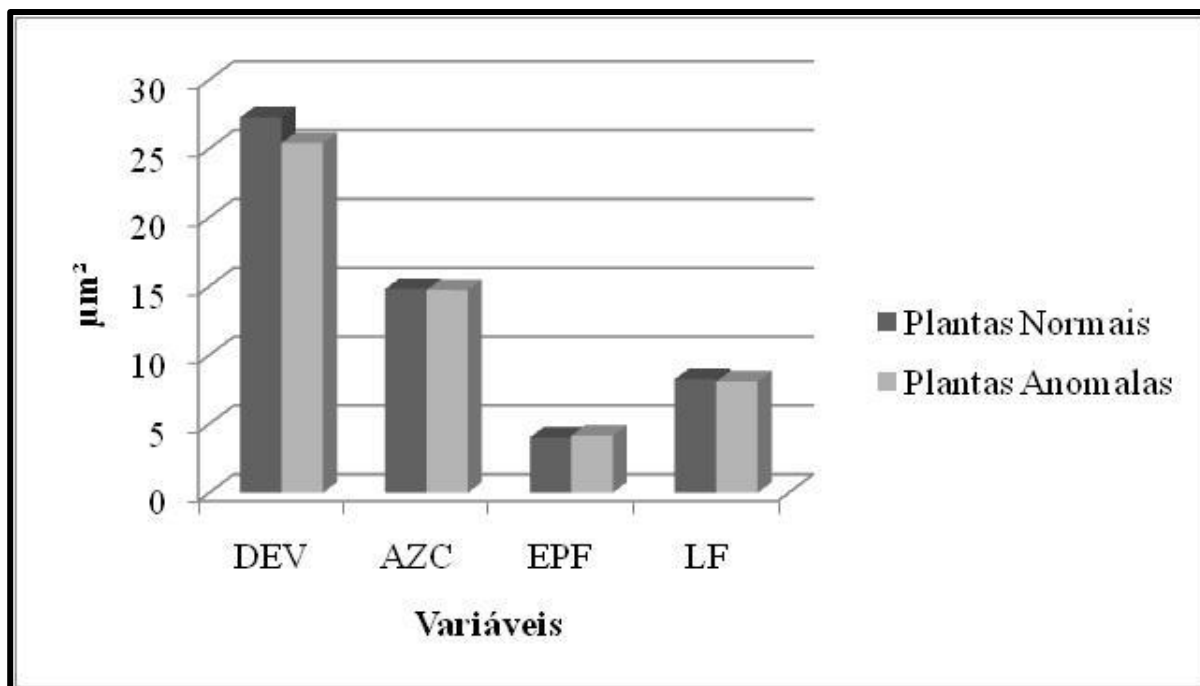
Tabela 16. Quadro de médias das variáveis da raiz: diâmetro dos elementos de vasos, altura da zona cambial, espessura das paredes das fibras e largura das fibras.

VARIÁVEIS	PLANTAS NORMAIS	PLANTAS ANOMALAS
DEV	27,28	25,41
AZC	14,81	14,74
EPF	4,03	4,15
LF	8,27	8,09

Diâmetro dos elementos de vasos (DEV), altura da zona cambial (AZC), espessura das paredes das fibras (EPF) e largura das fibras (LF).

Na Figura 11, temos a representação esquemática das médias das variáveis da raiz analisadas: diâmetro dos elementos de vasos (DEV), altura da zona cambial (AZC), espessura das paredes das fibras (EPF) e largura das fibras (LF).

Figura 11: Representação esquemática da média das variáveis da raiz.



Diâmetro dos elementos de vasos (DEV), altura da zona cambial (AZC), espessura das paredes das fibras (EPF) e largura das fibras (LF).

5.4 Análise Genética

Fuchs (2014) identificou e caracterizou os genes envolvidos na anomalia detectada em *Eucalyptus grandis* em fase inicial de desenvolvimento, através da determinação do perfil transcricional de plantas normais e anômalas; análise e validação da expressão gênica diferencial entre os fenótipos contrastantes; análise funcional e metabólica dos genes diferencialmente expressos; e identificação das vias metabólicas relevantes comparando-se os dois fenótipos.

Dos genes diferencialmente expressos, Fuchs (2014) encontrou 26 em folha, 59 em caule e 11 em raiz, e a grande maioria dos genes apresentaram superexpressão nas plantas anômalas. Em todos os órgãos, os genes superexpressos nas plantas anômalas eram mais representativos nas categorias funcionais 'Resposta à estímulos' e 'Processos metabólicos'. Apesar de o caule apresentar mais genes expressos diferencialmente, o órgão que apresentou mais vias metabólicas relevantes entre plantas normais e anômalas foi a folha.

Ainda de acordo com o trabalho realizado por Fuchs (2014), as famílias gênicas mais representativas na categoria funcional 'Resposta à estímulos' foram: quitinase classe I, proteínas similares à taumatina e proteínas da superfamília Bet v1. As quitinases possuem papel importante na resistência contra patógenos, agindo na degradação da quitina, constituinte da parede celular dos fungos (FLACH et al., 1992; KASPRZEWSKA, 2003). Por sua vez, as proteínas similares à taumatina (PR-5; osmotina) possuem atividade na permeabilização da membrana plasmática dos patógenos (RUIZ-MEDRANO et al., 1992; KITAJIMA e SATO, 1999).

As proteínas da superfamília Bet v1, de um modo geral, estão associadas à resposta de defesa contra estresses bióticos e abióticos (HOFFMANN-SOMMERGRUBER et al., 1997; WEN et al., 1997; LIU e EKRAMODDOULLAH, 2006), no entanto, sua função ainda não está totalmente esclarecida. Lourenção (2010) identificou uma marca molecular relacionada à anomalia estudada do eucalipto, possuindo identidade com genes PR-10 (domínio Bet v1), porém não chegou à conclusão de seu envolvimento direto ou indireto no desenvolvimento do caráter anômalo. Entretanto, estudos que envolvem fenótipos similares à anomalia, como o nanismo e a ramificação abundante, apresentam associação com genes relacionados à resposta de defesa (KNIGHT, 1947; BOMBLIES e WEIGEL, 2007; BOMBLIES et al., 2007). Knight (1947) demonstra que o gene determinante para o caráter anormal (tamanho reduzido e numerosas ramificações), em algodão, está estritamente ligado ao gene de resistência da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*.

Ao analisar os genes diferencialmente expressos nos diferentes órgãos, Fuchs (2014) observou que nas folhas, houve a superexpressão do gene relacionado com o aumento na atividade fotossintética no fenótipo anômalo. Ayres (1984 e 1991) e Ney et al (2013) relatam que o aumento na taxa fotossintética pode ocorrer como um mecanismo de compensação. Assim, a redução da fotossíntese no local da infecção induz o aumento da atividade fotossintética dos outros órgãos e tecidos não infectados, no intuito de contrabalancear os níveis dessa atividade funcional.

5.4.1 Análise da folha

APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO (2012) relatam que de acordo com a anatomia foliar, a especialização do tecido paliádico conduziu à eficiência da fotossíntese. No mesófilo claramente dorsiventral, a grande maioria dos cloroplastos é

encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à forma e ao arranjo das células do paliçádico, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes das células, utilizando o máximo de luz. Outro importante fator que aumenta a eficiência fotossintética é a ampliação de um sistema de espaços intercelulares no mesofilo, já que facilita as trocas gasosas. Devido ao arranjo das células do mesofilo, grandes superfícies das células ficam expostas e entram em contato com o ar, presente nos espaços intercelulares.

Desta maneira, através dos resultados obtidos nesse trabalho em relação ao estudo da anatomia foliar e da análise estatística, podemos sugerir que, uma vez que as folhas das plantas anômalas apresentam uma média da espessura do parênquima paliçádico próximo ao valor da média das plantas normais (tabela 5) e sendo os valores considerados não significativos pelo teste F (tabela 3), como também uma grande quantidade de espaços intercelulares com valores de suas áreas sendo significativos (figura 4F e tabela 3), mostra que nas plantas anômalas podem estar ocorrendo alterações anatômicas em busca de uma atividade fotossintética mais eficiente, já que esta variável está relacionada com a fotossíntese e, um maior desenvolvimento desse tecido pode permitir maior fixação de CO₂ com uma abertura dos estômatos em curto espaço de tempo (CASTRO et al., 2009). Silva et al., (2005) afirma ainda que quanto mais espessa a cutícula e mais compacto o parênquima paliçádico, mais resistente é a planta aos patógenos; porém o parênquima compacto pode interferir na distribuição de carbono acarretando menor eficiência fotossintética.

Outra característica relacionada com a fotossíntese observada no estudo são os estômatos. Foi observado que tanto nas plantas normais como nas anômalas, as folhas de eucalipto apresentaram limbo com intensa deposição de cera e estômatos em ambas as faces (figura 3). Porém, nas plantas normais o número de estômatos na face abaxial do limbo foliar foi bastante superior (63) ao número de estômatos encontrado nas folhas anômalas (37) (tabela 1), esta característica confere com a descrita na literatura para eucaliptos de acordo com Malinowsk (2009). Os estômatos devem funcionar para maximizar a assimilação CO₂ enquanto diminui o dano de desidratação, ou seja, a condutância estomática fornece uma ligação crucial entre a perda de água pela transpiração e ganho de carbono (e, portanto, do crescimento) e entre a economia de água pelo fechamento dos estômatos e maior estresse por calor (PITA et al., 2005).

Desta forma, podemos concluir que as plantas anômalas, apesar de apresentar um valor da espessura do parênquima paliçádico, que está associado com uma maior captação de luz, próximo ao das plantas normais e uma grande quantidade de espaços intercelulares, que facilita as trocas gasosas, mesmo com o desenvolvimento dessas duas características, a

defasagem na quantidade de estômatos das plantas anômalas, faz com que a absorção de luz seja pouca e a fotossíntese prejudicada.

5.4.2 Análise do caule

Em relação ao caule, apesar de ter apresentado mais genes expressos diferencialmente, este foi o órgão que apresentou menos vias metabólicas relevantes entre plantas normais e anômalas de acordo com Fuchs (2014). A autora ainda chama a atenção para a intensificação da produção de tiamina e de glicosinolatos nas plantas anômalas, onde a tiamina possui função na indução da expressão de proteínas relacionadas à defesa nas vias dependentes de ácido salicílico (WANG et al., 2006; GOYER 2010). E os glicosinolatos são componentes requisitados na deposição de calose entre a membrana e a parede celular (CLAY et al., 2009), impedindo a difusão célula a célula de microorganismos patogênicos (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

A lignificação da parede celular é uma estratégia de defesa, tornando-a mais resistente ao ataque de patógenos (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996; DURNER et al., 1997). No entanto, a lignificação precoce da parede celular impede a expansão celular e, conseqüentemente, restringe o crescimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2013), podendo ser responsável pela redução na altura e diâmetro da base do caule das plantas anômalas.

A calose pode ser sintetizada em resposta à lesão e outros estresses (TAIZ e ZEIGER, 2013). Em plantas de arroz (*Oryza sativa*), sua deposição é induzida e os genes da calose sintase são positivamente regulados em plantas atacadas por insetos sugadores de floema, reforçando o que foi observado por Fuchs (2014) em relação aos mecanismos de defesa da planta contra patógenos.

A calose é um polímero de glicose, encontrado nos tubos crivados do floema. A seiva do elemento do tubo crivado é rica em açúcares e outras moléculas orgânicas. Essas moléculas representam um investimento energético para a planta, e sua perda deve ser evitada quando os elementos de tubo crivado são danificados. Quando um tubo crivado é cortado ou perfurado, a diminuição da pressão provoca o deslocamento do conteúdo dos elementos crivados em direção à extremidade cortada, podendo levar a planta a perder muita seiva do floema, rica em açúcar, se não houvesse um mecanismo de vedação (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Resultados do presente trabalho mostram que há uma diferença significativa em relação ao diâmetro dos elementos de vasos entre as plantas normais e anômalas, já que os

elementos de vasos das plantas anômalas são menos desenvolvidos e com aspecto colapsado, principalmente no floema, uma vez que a lignificação precoce restringe o crescimento vegetal, levando a um transporte deficiente de substâncias, prejudicando o desenvolvimento geral da planta.

5.4.3 Análise da raiz

Em relação à raiz, foi o órgão que mostrou menor diferença entre plantas normais e anômalas, tanto anatomicamente quanto estatisticamente, já que entre todas as variáveis analisadas não houve diferença significativa.

De acordo com o analisado por Fuchs (2014), muitos estudos relatam homologia das proteínas PR-10 com ribonucleases, sugerindo que estas possuam papel importante em processos biológicos, assim como no desenvolvimento (WALTER et al., 1996; LIU e EKRAMODDOULLAH, 2006) e formação de raízes secundárias (POUPARD et al., 2001).

A autora ainda encontrou genes superexpressos para a proteína aquaporina na categoria de processos metabólicos das plantas anômalas. As aquaporinas (canais de água) são particularmente abundantes em membranas vegetais e em raízes são consideradas fundamentais no transporte de solutos e nutrientes (GASPAR, 2011; TAIZ e ZEIGER, 2013). Segundo Wudick et al. (2009), há uma grande variedade de aquaporinas, e essa grande variedade de aquaporinas em plantas poderia estar relacionada à seletividade aos diferentes substratos, aos diversos padrões de localização celular e tecidual, ao alto nível de compartimentalização das células vegetais e às diversas funções celulares que promovem o equilíbrio hídrico e osmótico entre os compartimentos.

As aquaporinas são altamente expressas em células epidérmicas e endodérmicas, bem como no parênquima do xilema, que podem ser pontos críticos para o controle do movimento da água (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Ao associar a literatura, as análises de Fuchs (2014) e os resultados obtidos neste trabalho, no qual as plantas anômalas apresentaram maior densidade de elementos de vasos (número de elementos de vasos por área do xilema) (tabela 14), sugerimos que essas características das raízes das plantas anômalas representem um mecanismo compensatório que visa aumentar o transporte de água e nutrientes, a fim de compensar danos causados pela mutação existente.

6. Conclusões

- Em relação ao limbo foliar das plantas anômalas, apesar de apresentar um valor da espessura do parênquima paliçádico, que está associado com uma maior captação de luz, próximo ao das plantas normais e uma grande quantidade de espaços intercelulares, que facilita as trocas gasosas, mesmo com o desenvolvimento dessas duas características indicando alterações anatômicas em busca de uma atividade fotossintética mais eficiente, a defasagem na quantidade de estômatos das plantas anômalas, faz com que a absorção de luz seja pouca e a fotossíntese prejudicada.
- Nas plantas anômalas, no estudo do caule, mostrou que os elementos vasculares são menos desenvolvidos e com aspecto colapsado, principalmente no floema, levando a um transporte deficiente de substâncias, prejudicando o desenvolvimento geral da planta, impedindo a expansão celular e conseqüentemente o crescimento em altura das plantas anômalas.
- As raízes das plantas anômalas apresentaram maior densidade de elementos de vasos (número de elementos de vasos por área do xilema), sugerindo que essa característica represente um mecanismo compensatório, visando aumentar o transporte de água e nutrientes, a fim de compensar danos causados pela mutação existente.
- Dos órgãos estudados, o limbo foliar foi o que apresentou maiores diferenças morfoanatômicas entre os materiais, e a raiz o que apresentou as menores diferenças entre os materiais.

7. Referências Bibliográficas

- Abraf – Associação Brasileira de Produtores de Floresta Plantada. 2013. Anuário estatístico ABRAF - ano base 2012. Brasília, 146p. Statistical Year Book – Base Year 2011. Brasília.
- Appenzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM. 2012. Anatomia Vegetal. 3 ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 404p.
- Assis TF, Bauer JFS, Tarel G. Sintetização de híbridos de *Eucalyptus* por cruzamentos controlados. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 3, n. 1, p. 161-170, 1993.
- Ayres PG. The interaction between environmental stress injury and biotic disease physiology. Ann. Rev. Phytopathol. 1984; 22:53-75.
- Ayres PG. Growth responses induced by pathogens and other stresses. In: Mooney HA, Winner WE, Pell EJ, editors. Response of Plants to Multiple Stresses. New York: Academic Press; 1991. p. 227-246.
- Bered F, Barbosa Neto JF, de Carvalho FIF. 1997. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. Ciência Rural, Santa Maria, 27(3): 513-520.
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, Hall N, Hyland BPM, Johnson RD, Kleinig DA, McDonald MW, Turner JD. 2006. Forest trees of Australia. Melbourne: CSIRO 5: 736p.
- Bomblies K, Lempe J, Epple P, Warthmann N, Lanz C, Dangl JL, Weigel D. 2007. Autoimmune response as a mechanism for a Dobzhansky-Muller-type incompatibility syndrome in plants. PLoS Biol. 5 1962–1972.
- Bomblies K, Weigel D. 2007. Hybrid necrosis: Autoimmunity as a common barrier to gene flow in plants. Nat Rev Genet 8: 382–393.
- Brisola SH, Demarco D. 2011. Análise anatômica do caule de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis x urophylla*: desenvolvimento da madeira e sua importância para a indústria. Sci. For., Piracicaba, v.39, n.91, p.317-330.
- Brooker MIH, Kleinig DA. 2004. Field guide to *Eucalyptus*, 2nd edition, volume 3, Melbourne, Australia: Bloomings Books.
- Castro et al. Histologia vegetal: Estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM. Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. Science. 2009; 323: 95-101.

- Cruz CD, Carneiro PCS. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v. 2, 585p., 2003.
- Cruz CD, Regazzi AJ. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 390 p., 1994.
- Dickson WC. 2000. Integrative Plant Anatomy. Academic Press, San Diego.
- Durner J, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci. 1997; 2: 266-274.
- Eldridge K.; Davidson J.; Harwood C.; Wyk G. van. Eucalypt domestication and breeding. Oxford, Clarendon, 288 p., 1993.
- Estopa RA. 2006. Comparação do desempenho no viveiro e no campo dos descendentes de clones de *Eucalyptus* spp. autofecundados e cruzados. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 62 p.
- Ferreira M, Santos PET dos. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: Iufro Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus*, 1997, Salvador. Proceedings... Colombo: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. v.1, p.14-34.
- Flach J, Pilet PE, Jollès P. What's new in chitinase research? Experientia. 1992; 48: 701-716.
- Fuchs MCP. 2014. Caracterização gênica para uma anomalia de *Eucalyptus* em fase inicial de desenvolvimento. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 85p.
- Gaspar M. 2011. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. Revista Brasileira de Botânica. V.34, n.4, p.481-491.
- Golle DP, Reiniger LRS, Curti AR, Bevilacqua CB. 2009. Forestry improvement: emphasis on biotechnology application. Ciência Rural, Santa Maria, 39(5):1606-1613.
- Gomes SM, Somavilla NSDN, Gomes-Bezerra KM, Miranda SC, De-Carvalho PS, Graciano-Ribeiro D. 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. Acta bot. Bras. 23(1): 223-238.
- Gonçalves JLM, Alvares CA, Higa AR, Silva LD, Alfenas AC, Stahl J, Ferraz SFB, Lima WP, Brancalion PHS, Hubner A, Bouillet JPD, Laclau JP, Nouvellon Y, Epron D. 2013. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. Forest Ecology and Management 301: 6–27.

- Goyer A. Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochemistry*. 2010; 71: 1615–1624.
- Grattapaglia D, Kirst M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. 2008. *New Phytologist* 179:911-929.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*. 1996; 8: 1773-1791.
- Hoffmann-Sommergruber K, Vanek-Krebitz M, Radauer C, Wen J, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H. 1997. Genomic characterization of members of the Bet v 1 family: genes coding for allergens and pathogenesis-related proteins share intron positions. *Gene*, 197:91-100.
- Huijser P, Klein J, Lönnig WE, Meijer H, Saedler H, Sommer H. *Bracteomania*. 1992. An inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J*. 11(4):1239–1249.
- Iba – Indústria Brasileira de Árvores. 2014. Disponível em: < <http://www.iba.org/pt/> >
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc Graw-Hill, New York.
- Kasprzewska A. Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2003; 8: 809 – 824.
- Kitajima S, Sato F. Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. *J. Biochem*. 1999; 125: 1-8.
- Klekowski Jr EJ. 1988. Genetic load and its causes in long-lived plants. *Trees*, 2:195-203.
- Knight RL. The genetics of blackarm resistance v. dwarf-bunched and its relationship to B *Journal of Genetics*. 1947; 48(1): 43-51.
- Koh HJ, Son YH, Heu MH, Lee HS, McCouch SR. 1999. Molecular mapping of a new genic male-sterility gene causing chalky endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 106:57-62.
- Ladiges PY, Udovicic F, Nelson G. 2003. Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography* 30: 989-998.
- Liu J-J, Ekramoddoullah AKM. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68:3-13.
- Lourenção JC. 2010. Caracterização de uma região genômica relacionada a uma anomalia de viveiro em *Eucalyptus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita

Filho”, Botucatu. 96p.

- Malinowski LRL, Nakashima T, Alquini Y. 2009. Caracterização morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* (Maiden *et al.*) J.B. Kiskpat. (Myrtaceae). Latin American Journal of Pharmacy. 28 (5): 756-61.
- Maschio LMA, Ferreira CA, Auer CG, Grigoletti Jr. A, Wiecheteck MRS, Nardelli AMB, Bernardi CA. 1996. Descrição de uma anomalia ocorrida em *Eucalyptus grandis* na região de Arapoti-PR, Brasil. Boletim de Pesquisa Florestal, n.32-33, p.85-87.
- Marx GA. 1983. Developmental mutants in some annual seed plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 34:389-417.
- Mendonça CBF. 2010. Anatomia e fisiologia vegetal. Universidade Castelo Branco. Rio de Janeiro: UCB, 48p.
- Ney B, Bancal MO, Bancal P, Bingham IJ, Foulkes J, Gouache D, Paveley N, Smith J. Crop architecture and crop tolerance to fungal diseases and insect herbivory. Mechanisms to limit crop losses. Eur J Plant Pathol. 2013; 135:561–580.
- O’Brien, T.P. et al. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. Protoplasma 59(2):368-373.
- Pita P, Cañas I, Soria F, Ruiz F, Toval G. Use of physiological traits in tree breeding for improved yield in drought-prone environments. The case of *Eucalyptus globulus*. Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, v. 14, p. 383-393, 2005.
- Poupard P, Brunel N, Leduc N, Viémont J-D, Strullu D-G, Simoneau P. Expression of a Bet v 1 homologue gene encoding a PR 10 protein in birch root: induction by auxin and localization of the transcripts by *in situ* hybridization. Aust. J. Plant Physiol. 2001; 28:57-63.
- Ramalho MAP, Santos JB, Pinto CABP. Genética na Agropecuária. 3ª ed. Lavras: UFLA; 2004.
- Rédei GP. 1975. *Arabidopsis* as a genetic tool. Annu. Rev. Genet. 9:111-127.
- Robards, A.W. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: Electron microscopy and cytochemistry of plant cells (Hall, J.L. (eds)). Elsevier, New York.
- Ruiz-Medrano R, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante RF. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. Plant Molecular Biology. 1992; 20: 1199-1202.
- Salisbury FB, Ross CW. Fisiologia das Plantas. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- Scarpinella GA. Reflorestamento no Brasil e o Protocolo de Quioto. São Paulo, 2002,

Dissertação (exigência para obtenção do título de mestre em energia) – Instituto de Eletrotécnica e Energia –IEE, Universidade de São Paulo.

Silva LM, Alquini Y, Cavallet VJ. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botânica Brasílica*, v. 19, n. 01, p. 183-194, 2005.

Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 6^a ed. The Iowa State University Press. 593p. 1974.

Souza RRS. Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem. 2008. 106p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

Tambarussi EV. 2006. Associação de marcador RAPD e desenvolvimento de marcador SCAR para um tipo de anomalia de viveiro em *Eucalyptus grandis*. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 31p.

Tuffi Santos LD, Iarema L, Thadeo M, Ferreira FA, Meira RMSA. Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. 2006. *Planta Daninha*, Viçosa, MG. V.24, n.3, p. 513-520.

Vencovsky R, Ramalho MAP. Contribuições do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: Paterniani E. (Ed.). *Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 57-89.

Walter MH, Liu J-W, Wünn J, Hess D. Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (Ypr10) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *Eur. J. Biochem*. 1996; 239:281-293.

Wang_G, Ding_X, Yuan M, Qiu D, Li X, Xu C, Wang S. Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. *Plant Molecular Biology*. 2006; 60:437–449.

Wen J, Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Breiteneder H. 1997. The Potential of Bet v 1 Homologues, a Nuclear Multigene Family, as Phylogenetic Markers in Flowering Plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3):317-333.

White JD, Scott NA. Specific leaf area and nitrogen distribution in New Zealand forests: Species independently respond to intercepted light. *Forest Ecology and Management*.

2006; 226(1-3): 319-329.

Wilcken CF, Lima ACV, Dias TKR, Masson MV, Filho PJF, Pogetto MHFAD. 2008.

Guia prático de manejo de plantações de eucaliptos. FEPAF, 19p.

Wudick MM, Luu D-T, Maurel C. 2009. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist* 184: 289-302.

Zobel B, Talbert J. 1984. *Applied forest tree improvement*. John Wiley and Sons, New York, NY. 505 p.