

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS E DE FOSFITO DE  
POTÁSSIO EM MUDAS DE EUCALIPTO SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**KAROLINE SANTOS GONÇALVES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutora  
em Agronomia (Irrigação e Drenagem).

BOTUCATU – SP

Abril – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS E DE FOSFITO DE  
POTÁSSIO EM MUDAS DE EUCALIPTO SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**KAROLINE SANTOS GONÇALVES**

Orientador: Prof. Dr. Antônio de Pádua Sousa  
Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutora  
em Agronomia (Irrigação e Drenagem).

BOTUCATU – SP

Abril – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA  
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

G635a      Gonçalves, Karoline Santos, 1982-  
Aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potás-  
sio em mudas de eucalipto submetidas à deficiência hídrica  
/ Karoline Santos Gonçalves. - Botucatu : [s.n.], 2013  
      xiii, 66 f. : grafs., tabs., ils. color., fots. color.

      Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2013

      Orientador: Antônio de Pádua Sousa

      Coorientador: Edivaldo Domingues Velini

      Inclui bibliografia

      1. Eucalipto - Mudas - Produção. 2. Plantas - Regulado-  
res. 3. Ácido salicílico. 4. Ácido jasmônico. 5. Água na  
agricultura. 6. Potássio na agricultura. I. Souza, Antônio  
de Pádua. II. Velini, Edivaldo Domingues. III. Universidade  
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de  
Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS E DE FOSFITO DE  
POTÁSSIO EM MUDAS DE EUCALIPTO SUBMETIDAS À  
DEFICIÊNCIA HÍDRICA"

ALUNA: KAROLINE SANTOS GONÇALVES


ORIENTADOR: PROF. DR. ANTÔNIO DE PÁDUA SOUSA

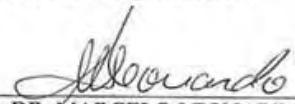
Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ANTÔNIO DE PÁDUA SOUSA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. CAIO ANTONIO CARBONARI

  
\_\_\_\_\_  
PROFª DRª MARITANE PRIOR

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. MARCELO LEONARDO

Data da Realização: 29 de abril de 2013.

*Aos meus pais,  
Luiz Alberto Moreira Gonçalves (in memorian) e Rosa Maria Santos Gonçalves;  
Às minhas irmãs,  
Ellen Gonçalves e Rosa Luíza Gonçalves.*

*Por todo amor, apoio e amizade.*

***Dedico***

*Às minhas avós, Risoleta Moreira de Almeida (in memorian) e Dalvina Moreira Santos (in memorian), por terem sido tão amáveis e especiais. Eu recordo com muita alegria e saudade os momentos que vivemos juntas.*

*Ao querido tio Rosalvo Santos (in memorian).*

***Ofereço***

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde, e por estar sempre presente;

À UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Irrigação e Drenagem pela oportunidade em realizar este curso;

Aos meus orientadores, grandes mestres e exemplos: Prof. Dr. Antônio de Pádua Sousa, Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini e a Prof<sup>ra</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jesús Sánchez-Blanco, por serem tão atenciosos e prestativos, pelo apoio e ensinamentos e pela amizade;

Aos colaboradores Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Bueno Trindade e ao Prof. Dr. Fernando Broetto;

Aos amigos e colegas de trabalho do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM): Natália Corniani, Rosilaine Araldi, Tiago Rombola, Leandro Tropaldi, José Guilherme Cordeiro, José Roberto Marques, Maria Rosecler Rossetto, Ilca Puertas e Luiz Marcelo Siono. A ajuda de vocês foi fundamental!

Às amigas Anne Caroline Arruda e Gabriela Ferraz, por tudo que vivemos juntas, pelo companheirismo nos momentos de alegria e de dificuldade, pelo carinho, pela sinceridade e por tudo que acrescentaram em minha vida. Vivemos como irmãs!

Às antigas colegas e agora incríveis amigas, Cássia Silva Linge e Olívia Nepomuceno, por estarem comigo no momento em que tanto precisei das coisas mais simples da vida;

Aos amigos de sempre: Ana Rosa Guedes, Vanessa das Neves, Bruna Fernandes, Juliana Alves e Cleilton Vasconcelos e aos novos amigos: Zoraide Costa, Cristiane Pilon, Miguel Menegazzo, Elza Oliveira e Rosário Soller;

Aos familiares, em especial à tia Maria de Jesus Moreira e ao primo Roberto Almeida;

Aos padrinhos Dulcinéia Comparotto e Bernardo Ferraz, pelo carinho e atenção;

À toda equipe do Departamento de Irrigação da Universidade de Murcia (Espanha), em especial à Maria Fernanda Ortuño, Maria José Gómez-Bellot, Sara Alvarez, Rosalia Alcobendas, Pedro Antonio Nortes, José Ramon Acosta e ao Dr. Juan Veras;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

À DURATEX, pela concessão das mudas de Eucalipto;

Às Secretarias do Departamento de Engenharia Rural e da Pós-Graduação;

Aos professores e aos queridos colegas do curso de Doutorado.

***Meus sinceros agradecimentos.***

*“Nas grandes batalhas da vida,  
o primeiro passo para a vitória  
é o desejo de vencer.”*

*(Mahatma Gandhi)*



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIII
RESUMO .....	1
SUMMARY .....	3
1 INTRODUÇÃO .....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
2.1 Aspectos gerais da cultura do <i>Eucalyptus</i> .....	7
2.2 A deficiência hídrica e os mecanismos de tolerância das plantas .....	9
2.3 Reguladores vegetais na interação planta-estresse .....	15
2.3.1 Ácido salicílico e seus derivados .....	17
2.3.2 Ácido jasmônico e seus derivados .....	21
2.4 Fosfito de potássio .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Condução dos experimentos .....	25
3.2 Variáveis avaliadas .....	28
3.2.1 Avaliação da taxa de transpiração .....	28
3.2.2 Taxa de transporte de elétrons (ETR) .....	30
3.2.3 Quantificação do teor de prolina foliar .....	31
3.2.4 Quantificação dos teores de lipoperóxidos .....	33
3.2.5 Teor de umidade das folhas .....	34
3.3 Análise dos resultados .....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1 Experimento I .....	36
4.2 Experimento II .....	42
5 CONCLUSÕES .....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Atributos físico-químicos do solo utilizado nos experimentos. ....	27
Tabela 2. Tratamentos aplicados em mudas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> . Botucatu - SP, 2013. ....	28
Tabela 3. Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do composto no modo de ionização positivo. Botucatu - SP, 2013. ....	32
Tabela 4. Curva analítica e faixas de concentração para o composto analisado. Botucatu - SP, 2013. ....	33
Tabela 5. Médias das variáveis avaliadas no primeiro experimento em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013. ....	37
Tabela 6. Médias das variáveis avaliadas no segundo experimento em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013. ....	43

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Esquema resumido dos sistemas de reação ou defesa das plantas. Fonte: Velini et al., 2009. ....	17
Figura 2. Estrutura química do ácido salicílico. ....	18
Figura 3. Biossíntese do ácido salicílico em plantas. As abreviaturas das enzimas se referem a: isocorismato sintase (ICS), isocorismato piruvato liase (PL), fenil amônia liase (PAL) e ácido benzóico 2-hidrolase (BA2H). Fonte: Martín, 2009. ....	19
Figura 4. Estrutura química do ácido jasmônico. ....	21
Figura 5. Temperaturas média, máxima e mínima durante os períodos de deficiência hídrica (áreas em cinza) para o experimento 1 (Maio) e o experimento 2 (Dezembro) no ano de 2011. Botucatu, SP. ....	26
Figura 6. Umidades relativas média, máxima e mínima durante os períodos de deficiência hídrica (áreas em cinza) para o experimento 1 (Maio) e o experimento 2 (Dezembro) no ano de 2011. Botucatu, SP. ....	26
Figura 7. Pulverizador manual pressurizado utilizado para a aplicação dos tratamentos (A) e aplicação dos compostos nas mudas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> (B). Botucatu – SP, 2011. ....	27
Figura 8. Plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> preparadas para a análise da taxa de transpiração. Botucatu - SP, 2011. ....	29
Figura 9. Detalhe da leitura do ETR em folhas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> , com o fluorômetro portátil (OS5p). Botucatu - SP, 2011. ....	30
Figura 10. Cromatógrafo Líquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) – LC-MS/MS. Botucatu - SP, 2011. ....	31
Figura 11. Cromatograma da prolina na concentração de 200 ng mL <sup>-1</sup> . Botucatu - SP, 2013.....	32

Figura 12. Procedimentos para quantificação dos teores de lipoperóxidos. Etapas da coleta e armazenamento das amostras (A-D) e preparação da amostra para leitura em espectrofotômetro (E-H). Botucatu - SP, 2011. ....	34
Figura 13. Médias da taxa de transpiração em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	37
Figura 14. Taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	39
Figura 15. Médias do teor de prolina foliar em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	40
Figura 16. Médias da taxa de transpiração em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	44
Figura 17. Médias da ETR em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	45
Figura 18. Médias do teor de prolina foliar em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	46
Figura 19. Médias dos teores de lipoperóxidos em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de	

potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013. ....	47
Figura 20. Correlação entre os teores de prolina foliar e a ETR em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E. urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013. ....	48
Figura 21. Correlação entre o teor de umidade e o ETR em plantas de <i>E. grandis</i> vs. <i>E.</i> <i>urophylla</i> submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013. ....	49

**ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

ADHJ	Ácido dihidro jasmônico
AJ	Ácido jasmônico
APX	Ascorbato peroxidase
AS	Ácido salicílico
BA2H	Ácido benzóico 2-hidrolase
CAT	Catalase
CTC	Capacidade de troca de cátions
ETR	Taxa de transporte de elétrons
ICS	Isocorismato sintase
MDA	Malondialdeído
MeJ	Metil jasmonato
MeDHJ	Metil dihidro jasmonato
MeS	Metil salicilato
M.O.	Matéria orgânica
PAL	Fenilalanina amônio liase
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Isocorismato piruvato liase
FSII	Fotossistema II
SABP2	Proteína 2 ligante de AS
SB	Soma de bases
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
V	Saturação por bases
v/v	Volume/volume
12-oxo-PDA	Ácido ciclopentanona 12-oxofitodienóico

## RESUMO

O eucalipto está sujeito a fatores ambientais que afetam desfavoravelmente o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, como condições adversas de radiação solar, temperatura e disponibilidade hídrica, sendo este último, o fator mais limitante. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio em mudas de híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla* submetidas à deficiência hídrica. Foram conduzidos dois experimentos, em delineamento experimental inteiramente casualizado com nove tratamentos e quatro repetições, em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia, pertencente ao Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, localizada no município de Botucatu (SP). Cada parcela experimental foi composta por um vaso contendo 5 L de solo, no qual foi transplantada uma muda no estágio de 3 a 4 pares de folhas. Os tratamentos foram aplicados quando as plantas estavam uniformes e bem aclimatadas, via pulverização foliar, utilizando 50 mL de solução com a dose específica de cada regulador vegetal e do fosfito de potássio. A deficiência hídrica foi imposta 7 dias após a aplicação dos tratamentos, por meio da suspensão da água de irrigação. No primeiro experimento cada tratamento constituiu-se de 1000 g ha<sup>-1</sup> do regulador vegetal (ácido salicílico (AS), metil salicilato (MeS), ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJ), ácido dihidro jasmônico (DHJ) e metil dihidro jasmonato (MeDHJ)) e 5 L p.c. de fosfito de potássio. Foram adotados dois tratamentos testemunhas, sem aplicação de compostos, sendo um deles submetido à deficiência hídrica e o outro irrigado. No segundo experimento foram utilizados os mesmos tratamentos, com exceção dos tratamentos com

AS e MeS que tiveram as doses reduzidas para 200 g ha<sup>-1</sup> devido a intoxicação observada nas plantas destes tratamentos no primeiro experimento. As variáveis avaliadas foram: taxa de transpiração, taxa de transporte de elétrons (ETR), teor de prolina e de lipoperóxidos nas folhas e teor de umidade das folhas. Os resultados obtidos mostram que o estresse por deficiência hídrica elevou os teores de prolina e de lipoperóxidos e reduziu o ETR nas folhas de eucalipto, contudo a aplicação dos reguladores vegetais e do fosfito de potássio atenuaram os efeitos do estresse hídrico nas plantas, sendo que a aplicação dos AJ e MeJ atenuaram os efeitos do estresse além de reduzir a taxa de transpiração das plantas. Verificou-se que o ETR permite estimar, de modo não destrutivo, o teor de umidade nas folhas de plantas de eucalipto.

---

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*, ácido salicílico, ácido jasmônico.



APPLICATION OF PLANT GROWTH REGULATORS AND POTASSIUM PHOSPHITE IN EUCALYPTUS SEEDLINGS SUBMITTED TO WATER STRESS. Botucatu, 2013. 66p. Tese (Doutorado em Agronomia/Irrigação e Drenagem) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: KAROLINE SANTOS GONÇALVES

Adviser: Dr. ANTÔNIO DE PÁDUA SOUSA

Co-Adviser: Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

## SUMMARY

Eucalyptus is subject to environmental factors that affect negatively the plant growth, development and productivity, as adverse conditions of solar radiation, temperature and water availability, the latter being the most limiting factor. The aim of this study was to evaluate the effects of exogenous application of plant growth regulators and potassium phosphite in hybrids seedlings of *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla* subjected to water stress. Two experiments were conducted in completely randomized design with nine treatments and four replications in a greenhouse at Nucleus of Advanced Research in Weed Science, in the Crop Science Department of the College of Agricultural Science, UNESP, located in Botucatu, SP, Brazil. Each plot consisted of a vase containing 5 liters of soil in which a seedling was transplanted in 3-4 pairs of leaves stage. When the plants were uniform and acclimated treatments were sprayed on the leaves using 50 mL of solution with the specific dose for each plant growth regulator with the specific dose

for each plant growth regulator and potassium phosphite. Water stress was imposed 7 days after treatment application, through irrigation water suspension. In the first experiment, each treatment consisted of 1000 g ha<sup>-1</sup> of plant growth regulator (salicylic acid (AS), methyl salicylate (MeS), jasmonic acid (AJ), methyl jasmonate (MeJ), dihydro jasmonic acid (DHJ) and methyl dihydro-jasmonate (MeDHJ)) and 5 L of potassium phosphite. Two control treatments were used, without the application of compounds, one subjected to water stress and other irrigated. In the second experiment the same treatments were used, except for treatment AS and MeS, where the doses were reduced to 200 g ha<sup>-1</sup> due to plants intoxication observed in these treatments in the first experiment. The parameters evaluated were: transpiration rate, electron transport rate (ETR), proline and lipoperoxides content in leaves and moisture content. The results showed that water stress increased proline and lipoperoxides content and reduced the ETR in the eucalyptus leaves, however the application of plant growth regulators and potassium phosphite attenuated the water stress effects, and the application of AJ and MeJ attenuated the stress effects besides reduce the plant transpiration rate. The ETR allows estimate, nondestructively, the moisture content in the eucalyptus leaves.

---

**Keywords:** *Eucalyptus*, salicylic acid, jasmonic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Eucalyptus* destacam-se dentre as espécies florestais devido às características de alta produtividade, crescimento rápido e capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. No Brasil, são muito utilizadas para o reflorestamento e o seu cultivo comercial responde por grande parte do sucesso da atividade florestal, sobretudo nos setores ligados a produção de papel, celulose e madeira.

Igualmente a outras culturas, o eucalipto está sujeito a fatores ambientais que afetam desfavoravelmente seu crescimento, desenvolvimento e produtividade, como condições adversas de radiação solar, temperatura e disponibilidade hídrica, sendo este último, o fator mais limitante, pois, segundo Taiz e Zaiger (2009), a água é o principal constituinte das plantas e uma pequena redução na disponibilidade de água no solo pode afetar drasticamente seu metabolismo.

As plantas possuem defesas constitutivas ou induzidas, que se manifestam em resposta aos estresses bióticos e abióticos e compreendem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. No caso de estresse por deficiência hídrica as alterações morfológicas mais comuns são a redução da área foliar, o fechamento estomático e o crescimento do sistema radicular (LOPEZ et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). As alterações fisiológicas e bioquímicas dependem do genótipo da planta, mas geralmente compreendem menor potencial hídrico nas folhas (LIBERATO et al., 2006), redução da eficiência quântica do fotossistema II (SILVA et al., 2007) e do teor relativo de água da folha (SILVA et al., 2007; LOBATO et al., 2008), decréscimos na condutância

estomática e na taxa fotossintética (POLIZEL, 2007), além de ajustamento osmótico, com acréscimos na síntese de açúcares e prolina (MCCORMICK, 2007; CAMPOS et al., 2011).

Existem compostos orgânicos que são produzidos constitutivamente pelas plantas e tem seu nível incrementado em resposta aos estresses. Estes compostos funcionam como indutores de resistência e são chamados hormônios vegetais. As plantas produzem uma grande variedade de hormônios vegetais entre os quais se incluem as auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas e etileno. Recentemente, outros compostos que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento vegetal têm sido descritos, dentre eles o ácido salicílico (AS) e o ácido jasmônico (AJ).

A maioria desses hormônios vegetais possuem substâncias sintéticas análogas que, ao serem aplicadas na planta, produzem efeitos similares aos produzidos pelos hormônios. Essas substâncias são conhecidas como reguladores vegetais e em pequenas quantidades promovem, inibem ou modificam os processos fisiológicos das plantas.

Os AS e AJ estão envolvidos na ativação das respostas de defesa das plantas sob condições de estresse, sobretudo os causados por patógenos e fatores ambientais. Evidências recentes tem sugerido que esses hormônios poderiam ter relação com a expressão de alguns genes envolvidos na defesa e na sinalização das respostas a estresses hídricos (KERBAUY, 2008).

O fosfito de potássio é um composto importante para a produção vegetal, inclusive de espécies arbóreas, e consiste numa fonte de nutrientes (P e K) que permitem corrigir rapidamente deficiências nutricionais, melhorando o desenvolvimento das plantas e a sua atividade fisiológica, ao mesmo tempo em que estimulam a criação de mecanismos naturais de defesa.

A aplicação de reguladores vegetais, bem como do fosfito de potássio, como agentes que favorecem a tolerância a estresses abióticos, podem ajudar a conhecer o papel regulador destes compostos nos mecanismos de adaptação ao estresse hídrico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação exógena de reguladores vegetais (ácido salicílico, metil salicilato, ácido jasmônico, metil jasmonato, ácido dihidro jasmônico e metil dihidro jasmonato) e de fosfito de potássio em mudas de híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla* submetidas à deficiência hídrica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aspectos gerais do gênero *Eucalyptus*

Pertencente à família *Myrtaceae*, que concentra elementos voláteis nas folhas, o gênero *Eucalyptus* possui mais de 900 espécies e subespécies naturais ou decorrentes de hibridação, algumas das quais pouco conhecidas, e que podem ser encontrados desde a forma arbustiva até árvores de grande porte (BROOKER; KLEINIG, 2004; 2006). É originário da Austrália e de regiões próximas, existindo apenas um pequeno número de espécies próprias dos territórios vizinhos da Nova Guiné, Indonésia e sul das Filipinas. Apresenta ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes condições edafoclimáticas, explorando àquelas das regiões de origem (SANTOS et al., 2001). Devido a esta característica, encontra-se distribuído por todos os continentes, com exceção da Antártida e com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e da Austrália.

É difícil precisar como e quando ocorreu a introdução do eucalipto no Brasil. Há relatos que datam o ano de 1825, plantados como ornamental no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e outros o ano de 1868 com a introdução de alguns exemplares no Rio Grande do Sul. Independentemente de quando eles foram introduzidos no Brasil, o certo é que as primeiras espécies foram plantadas para fins decorativos, como quebra-ventos ou pelo óleo essencial. Contudo, em outros países, as árvores de eucalipto já se destacavam como produtoras de madeira, devido ao seu rápido crescimento e rusticidade.

Sua expansão ganhou impulso nos primeiros anos do século XX com o trabalho do primeiro brasileiro a se interessar pelo estudo e cultivo da planta: o silvicultor Edmundo Navarro de Andrade. Na antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro, o cientista promoveu plantios de árvores para alimentar caldeiras das locomotivas e produzir dormentes, mourões e postes (VIANA, 2004). Desde então, o eucalipto vêm sendo extensivamente utilizado em plantios florestais, para atender a diferentes usos industriais, com ampla aceitação no mercado. Ele é utilizado como matéria-prima na produção de celulose e papel, de madeira sólida usada em móveis, pisos, revestimentos e outras aplicações na construção civil, na produção de carvão vegetal e lenha para a geração de energia e é também fonte de matéria-prima e óleos essenciais para a indústria de remédios e de produtos de limpeza.

A expansão das florestas plantadas com o gênero *Eucalyptus* no Brasil resulta de uma série de fatores que favorecem o seu plantio em larga escala, dentre os quais se destacam o rápido crescimento em ciclo de curta rotação, a alta produtividade e a qualidade da madeira, além de ser um gênero com muitas espécies e variedades adaptadas às diversas condições de clima e solo. Devido a estas características, o eucalipto consolidou-se no setor florestal e passou a ser considerado uma fonte de riqueza econômica e social, gerando empregos diretos e indiretos (SILVA, 2005). Atualmente, o Brasil possui pouco mais de 4,8 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto, sendo que grande parte está concentrada nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia (ABRAF, 2012) e, sua produtividade se destaca por ser das mais elevadas do mundo, com taxas que variam de 38 a 54 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (STAPE, 2008).

As espécies mais plantadas são *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. dunnii*. No entanto, da área total plantada com eucalipto no Brasil, aproximadamente 50% é ocupada por algum tipo de híbrido (BRACELPA, 2008). A hibridação interespecífica tornou-se uma forma rápida e eficiente de obtenção de ganhos genéticos no melhoramento de espécies de *Eucalyptus*, com reflexos diretos e significativos na indústria florestal. A busca de complementaridade nas características tecnológicas da madeira, a tolerância a estresses bióticos e abióticos, bem como a manifestação da heterose foram verificadas em vários cruzamentos híbridos, como por exemplo, no híbrido interespecífico *E. grandis* vs. *E. urophylla*, denominado “urograndis” (ASSIS; MAFIA, 2007).

A primeira plantação clonal com o híbrido urograndis ocorreu em 1979 no Estado do Espírito Santo, mas foi na década de 1990 que seu uso impulsionou o

ritmo de crescimento florestal, bem como a qualidade mais homogênea das florestas plantadas (LOPES, 2008). Este híbrido se destacou no cenário florestal brasileiro, pelo crescimento rápido, com ciclos de corte entre seis e sete anos de idade e pelo bom desempenho na produção de celulose e papel (BASSA, 2007).

## **2.2 A deficiência hídrica e os mecanismos de tolerância das plantas**

A deficiência hídrica, no solo e na atmosfera, juntamente com alta temperatura e radiação, têm sido citadas como as principais restrições à sobrevivência e as produtividades agrônoma e florestal (FLEXAS et al., 2002). Dentre estas restrições, a água é considerada o fator mais limitante para sustentabilidade dos sistemas agrícolas (PAIVA et al., 2005; CHAVES et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009), pois além de afetar as relações hídricas e alterar o metabolismo das plantas, a limitação em sua disponibilidade é fenômeno que ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis, causando redução severa na produtividade das culturas (NOGUEIRA et al., 2001).

O estresse por deficiência hídrica é produzido tanto pela limitação de água no solo quanto por perda excessiva pela transpiração em relação à absorção feita pelas raízes, sendo esses processos influenciados por fatores ambientais e por características da própria planta (SANT'ANNA, 2009).

A seca é uma condição meteorológica, tolerada pelas plantas que sobrevivem a ela e evitada por nenhuma, assim, plantas capazes de obter mais água ou que possuem maior eficiência de uso, resistem melhor aos períodos de escassez. Plantas dos tipos fotossintéticos C4 e CAM conseguem explorar ambientes mais áridos (TAIZ; ZEIGER, 2009), diferentemente do tipo C3, caso do eucalipto. Apesar disso, os avanços no estudo da eficiência do uso da água têm demonstrado que o eucalipto possui mecanismos fisiológicos que regulam a absorção e a perda de água, influenciando diretamente a produtividade florestal (LOPES, 2008).

Em condições normais as moléculas biológicas encontram-se hidratadas em seu estado natural e em casos de desidratação rápida pode ocorrer a desnaturação irreversível das proteínas, já que é a água o solvente, por meio do qual, gases minerais e outros solutos entram na célula e se movimentam de uma para outra e de um órgão para o outro (MARENCO; LOPES, 2005). Além disso, a água é essencial aos

diversos processos metabólicos das plantas, sobretudo por ser reagente de numerosas reações químicas e bioquímicas, como a fotossíntese, e essencial para o alongamento e o crescimento celular, a abertura dos estômatos e os movimentos plásticos das folhas, sendo que quando as células perdem sua turgidez, a planta murcha, e todos esses processos ficam comprometidos (MARENCO; LOPES, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A irrigação deve repor ao solo a quantidade de água retirada pela cultura e o momento de se irrigar é aquele em que a disponibilidade de água no solo assume valor mínimo, abaixo do qual a planta começa a sentir os efeitos da restrição de água (TORMENA et al., 1999). Com a diminuição gradativa do conteúdo de água disponível no solo, o desenvolvimento das plantas é afetado e pode variar em função das características adaptativas da espécie, do estágio de desenvolvimento da planta, da possibilidade de aclimação e da severidade do déficit de água (SANTOS; CARLESSO, 1998; CALBO; MORAES, 2000).

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alternando com momentos de normalidade. Considerados esses fatores, as plantas podem manifestar resistência ou tolerância, sobrevivendo e, às vezes, até crescendo, mesmo que em menores taxas ou podem manifestar sensibilidade sofrendo redução do crescimento e, dependendo da intensidade do estresse, podendo chegar à morte (CAMBRAIA, 2005).

Quando a ocorrência do déficit hídrico é rápida, os mecanismos morfofisiológicos são severamente afetados e a planta necessita adaptar-se rapidamente à nova condição. Assim, plantas irrigadas normalmente apresentam menos resistência a situações de deficiência hídrica no solo, enquanto que as plantas cultivadas sob déficit hídrico gradual ou à deficiência de água no solo no início do seu ciclo, se adaptam mais facilmente. A tolerância da planta a deficiência hídrica parece ser um importante mecanismo de resistência, para manutenção do processo produtivo em condições de baixa disponibilidade de água às plantas (SANTOS; CARLESSO, 1998).

Alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas podem ocorrer na planta em consequência do estresse por deficiência hídrica. As alterações morfológicas mais comuns são a redução na área foliar, fechamento estomático e crescimento do sistema radicular (LOPEZ et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). Já as alterações fisiológicas e bioquímicas dependem do genótipo da planta, mas geralmente compreendem menor potencial hídrico nas folhas (LIBERATO et al., 2006), redução da eficiência quântica do



fotossistema II (SILVA et al., 2007) e do teor relativo de água da folha (SILVA et al., 2007; LOBATO et al., 2008), decréscimos na condutância estomática e taxa fotossintética (POLIZEL, 2007), além de ajustamento osmótico, com acréscimos na síntese de açúcares e prolina (MCCORMICK et al., 2008; CAMPOS et al., 2011).

As plantas apresentam estratégias de defesa contra estresses bióticos e abióticos que podem ser constitutivas ou induzidas. Segundo Velini et al. (2009), após a detecção do estresse na planta, genes de resistência são ativados promovendo reações genéricas ou específicas que ativam ou inibem várias rotas metabólicas, modificando toda a síntese e acumulação de compostos. Em certas condições e em algumas plantas, um composto que é produzido constitutivamente, pode ter seus níveis incrementados em resposta a um ataque externo. Em alguns casos, um composto pode ser constituinte nas raízes, mas induzido nas folhas da mesma planta, ou vice-versa (DÍAZ, 2009).

O efeito da deficiência hídrica sobre as plantas é complexo, e as mesmas respondem através de vários processos adaptativos, não havendo, para tanto, mecanismo universal de resistência à seca, mas sim certos tipos de adaptações dentro de cada grupo ecofisiológico que as permitem resistirem à escassez de água. Essas respostas estão relacionadas com a capacidade de reduzir o potencial hídrico, aliadas às adaptações na morfologia e fisiologia das plantas que se traduzem em evitar ou transpor os efeitos letais da seca, sendo que embora esses parâmetros sejam avaliados, na maioria das vezes, isoladamente, as plantas utilizam mecanismos associados para a manutenção da vida em ambientes adversos (NOGUEIRA et al., 2005). De acordo Beever (2000) uma resposta específica ao déficit hídrico representa, na realidade, a combinação de eventos moleculares prévios, que foram ativados pela percepção do sinal de estresse.

Conforme citado anteriormente, as plantas passam por mudanças fundamentais na relação da célula com a água e nos processos morfofisiológicos e nutricionais, influenciando na sua capacidade de resistir às condições adversas do meio. O desenvolvimento de mecanismos de adaptação a condições adversas, como o estresse hídrico, tem o componente genético, sendo assim, mesmo entre plantas de uma mesma espécie, há respostas diferentes quanto à adaptação a estas condições (ARRIEL, 2004).

O crescimento celular é uma das características morfológicas mais sensíveis à deficiência hídrica e, na maioria das vezes, é reduzida mesmo antes da atividade fotossintética ou da condutância estomática. Quando o conteúdo de água em um

tecido ou célula está abaixo do conteúdo mais alto, exibido no estado de maior hidratação, a planta se encontra em déficit hídrico, que pode provocar vários efeitos sobre o crescimento, principalmente no consumo de assimilados das folhas em expansão e na fotossíntese, que em geral, é proporcional a área foliar. Por conseguinte, há restrição ao acúmulo de massa, prejudicando tanto o crescimento inicial das plantas como os estádios mais tardios, refletindo em limitações na área foliar e no número de folhas, além de acelerar a senescência e a abscisão das folhas e afetar o número e as taxas de crescimento dos ramos e o crescimento do caule (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em situação de baixa disponibilidade hídrica no solo, as plantas reduzem a perda de água ao reduzir a condutância estomática, ou seja, ao absorverem  $\text{CO}_2$ , inevitavelmente as plantas perdem água pelas folhas, contudo quando submetidas a condições de estresse por déficit hídrico, elas controlam a perda de água através dos estômatos utilizando mecanismos para controlar o seu grau de abertura (PAIVA et al., 2005). Portanto, o fechamento estomático é provavelmente uma das primeiras linhas de defesa da planta contra a perda de água, como também é o fator mais importante de controle da fixação do carbono, reduzindo a transpiração com reflexos diretos na fotossíntese (NOGUEIRA et al., 2005). Segundo Souza et al. (2004), o controle da perda de água pelo fechamento estomático consegue manter elevado o potencial hídrico e o conteúdo relativo de água nas folhas, mas, como consequência, há restrições na condutância estomática e trocas gasosas, o que reduz a taxa de transpiração, a assimilação de  $\text{CO}_2$  e o desenvolvimento da planta.

Estudos com eucalipto tem comprovado que a produção de matéria seca total é linearmente proporcional à quantidade de água usada pela cultura (ALVARENGA, 1994; SASSE et al, 1996; ISMAEL, 2001; SILVA, 2003; LOPES, 2004). Como os estômatos fecham durante os estádios iniciais do estresse hídrico, pode haver um aumento da eficiência do uso da água, mais  $\text{CO}_2$  pode ser absorvido por unidade de água transpirada, porque o fechamento estomático inibe a transpiração mais do que diminui as concentrações intercelulares de  $\text{CO}_2$  (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em relação à fase de transporte de elétrons durante a fotossíntese nas plantas, tem-se que a luz é absorvida por pigmentos do complexo antena, que, ao excitarem os elétrons, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas II e I (YOUNG; FRANK, 1996). Quando ocorre excesso de energia, esta pode ser dissipada na forma de fluorescência (KRAUSE; WINTER, 1996). O estresse hídrico poderá promover

efeitos deletérios nos cloroplastos interferindo na eficiência da fotossíntese inativando o fotossistema II (P680 ou FSII) e a cadeia de transporte de elétrons que daria origem ao ATP e NADPH<sub>2</sub> (COSTA et al., 2003). A fluorescência da clorofila pode ser utilizada como um mecanismo eficiente para medições fotossintéticas (GENTY et al., 1989) e fornece informações rápidas e não destrutivas acerca da conversão, transferência e dissipação da energia luminosa em nível de fotossistema II (BILGER et al., 1995). Para esse tipo de avaliação são utilizados fluorômetros, em aplicações que variam desde a rápida identificação de injúrias causadas ao aparelho fotossintético, mesmo quando o sintoma ainda não é visível, até a análise detalhada da alteração da capacidade fotossintética da planta (ARALDI et al., 2012).

Outra alteração metabólica importante para as plantas em condições de estresse, inclusive o estresse hídrico, é a indução do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As principais formas de ERO são o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (OH). Em situações de estresse as ERO podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa (LEVINE et al., 1994; LOW; MÉRIDA, 1996) podendo ser vistas tanto como indicadores celulares de estresse como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Quantidades mais elevadas de ERO ocasionam o estresse oxidativo caracterizado por severas injúrias, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, modificações protéicas, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (MOLLER et al., 2007). A ocorrência da peroxidação lipídica em membranas causa danos na estrutura e funcionamento da mesma, alterando sua fluidez, inativando receptores e enzimas da membrana (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). A alteração nos teores de lipoperóxidos é indicador de prevalência de dano oxidativo nos tecidos (CATANEO et al., 2005), causado por fatores como o estresse hídrico. Em plantas submetidas a severo estresse hídrico, Baisak et al. (1994) observaram aumento dos teores de lipoperóxidos.

A relação direta entre a redução da concentração interna de CO<sub>2</sub>, em razão do fechamento estomático, gera decréscimos na assimilação de CO<sub>2</sub> e no rendimento quântico do fotossistema II. Há evidências de que os efeitos do estresse hídrico sobre o fotossistema II podem ser mediados pela produção e acumulação de ERO, que provocam extensivos danos às membranas, desencadeando processos peroxidativos de

lipídios, com perda de eletrólitos pela célula e consequente perda de turgescência (QUEIROZ et al., 2002).

A deficiência hídrica caracteriza-se como um dos estresses ambientais responsáveis por promover ajustes no metabolismo celular, favorecendo a turgescência da célula via acúmulo de substâncias orgânicas (SILVA et al., 2004), dentre as quais destaca-se o acúmulo de uma mistura complexa de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, a qual tem sido denominada de ajustamento osmótico ou osmorregulação (NOGUEIRA et al., 2001; NUNES, 2007). Por meio deste mecanismo, as plantas conseguem diminuir o potencial hídrico sem que haja redução da turgidez das células vegetais, permitindo a continuidade de processos fisiológicos essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento (DESTRO, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009). Contudo, para Serraj e Sinclair (2002), o ajuste osmótico permite a sobrevivência da planta em deficiência hídrica, mas não mantêm o crescimento e a produtividade.

Estudos têm mostrado que, em resposta à deficiência hídrica, muitas plantas sintetizam e acumulam açúcares, tais como sacarose, sorbitol e oligossacarídeos, manitol, aminoácidos (prolina) e aminas (glicina, betaína e poliaminas) (TAJI et al., 2002; SHULAEV et al., 2008).

O acúmulo de prolina quando as plantas entram em déficit de água, tem sido relatado e estudado desde 1954 e existem contradições em relação à função do acúmulo de prolina em plantas submetidas a estresse. Alguns autores afirmam que a prolina teria funções ligadas a processos de adaptação ao déficit hídrico (SINGH et al., 1973), enquanto outros autores apontam a prolina como indicador de estresse (BECHER; FOCK, 1986).

Larcher (2004) relata que, sob influência de estresses ambientais, a síntese de proteínas é inibida e a degradação é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres, apresentando como característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas, uma mudança nas proporções de aminoácidos e, frequentemente, um aumento elevado na concentração de prolina livre. Segundo Marin (2003), a prolina acumula-se nas células com função osmoprotetora, prevenindo a desnaturação de proteínas e preservando a estrutura de enzimas. Acredita-se que a prolina atue no ajustamento osmótico, na estabilização de estruturas subcelulares e na eliminação de radicais livres, ou ainda participe na constituição de um estoque de N e C que poderia ser utilizado depois do período de estresse (TAYLOR, 1996; LEITE et al., 2000).

Em diferentes culturas a prolina livre é acumulada no tecido foliar quando há redução no potencial hídrico da folha (HANSON et al., 1979, SAWAZAKI et al., 1981; SAWAZAKI et al., 1985, CASTRO et al., 2007; ALVARENGA et al., 2011). Segundo Tully et al. (1979) o acúmulo de prolina parece decorrer do estado interno de água das folhas, pois as que mais rapidamente apresentam sintomas de dessecação são as que mais rápido acumulam prolina.

A capacidade de acumular prolina, observada durante a falta de água, tem sido associada com a tolerância das plantas a essa condição desfavorável, contudo, não se pode afirmar que plantas com alto acúmulo de prolina são tolerantes à seca, visto que, o menor acúmulo de prolina resulta da capacidade de manutenção de alto nível de água durante o estresse, sendo este evento considerado como um fator de sobrevivência da folha (SAWAZAKI et al., 1981).

Conforme o abordado, pode-se notar que dentre os fatores ambientais que podem influenciar negativamente a produtividade dos plantios de eucalipto, a deficiência hídrica é um dos que mais afeta e causa prejuízos. Assim, compreender a adaptação da fisiologia dessas plantas às condições ambientais, por meio de estudos envolvendo aspectos fisiológicos e bioquímicos em relação às repostas das plantas ao estresse causado pela deficiência hídrica são de grande relevância.

### **2.3 Reguladores vegetais na interação planta - estresse**

Os hormônios vegetais constituem uma vasta gama de compostos orgânicos, não nutrientes, produzidos em uma parte da planta e translocados para outra parte onde, em minúsculas concentrações, desencadeiam respostas fisiológicas específicas, relacionadas com a regulação do crescimento e da defesa das plantas (LESSENGER, 2006).

Existem compostos análogos aos hormônios vegetais que ao serem aplicados exogenamente nas plantas desempenham funções similares. Tais compostos são denominados reguladores de crescimento vegetal ou simplesmente, reguladores vegetais. Os reguladores vegetais são compostos químicos, de origem natural (extratos de fontes naturais quaisquer) ou sintética (sintetizados em laboratórios), necessários em

pequeníssimas quantidades para promover, inibir ou modificar os processos fisiológicos da planta (PESSARAKLI, 2001).

Baseado nas características químicas e nos efeitos que exercem os hormônios vegetais ou reguladores vegetais são classicamente agrupados em cinco principais categorias: giberelinas, citocininas, auxinas, etileno e ácido abscísico (COLLI, 2008). Atualmente inclui-se neste grupo o ácido salicílico, os jasmonatos, brassinosteróides, poliaminas e oligossacarinas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

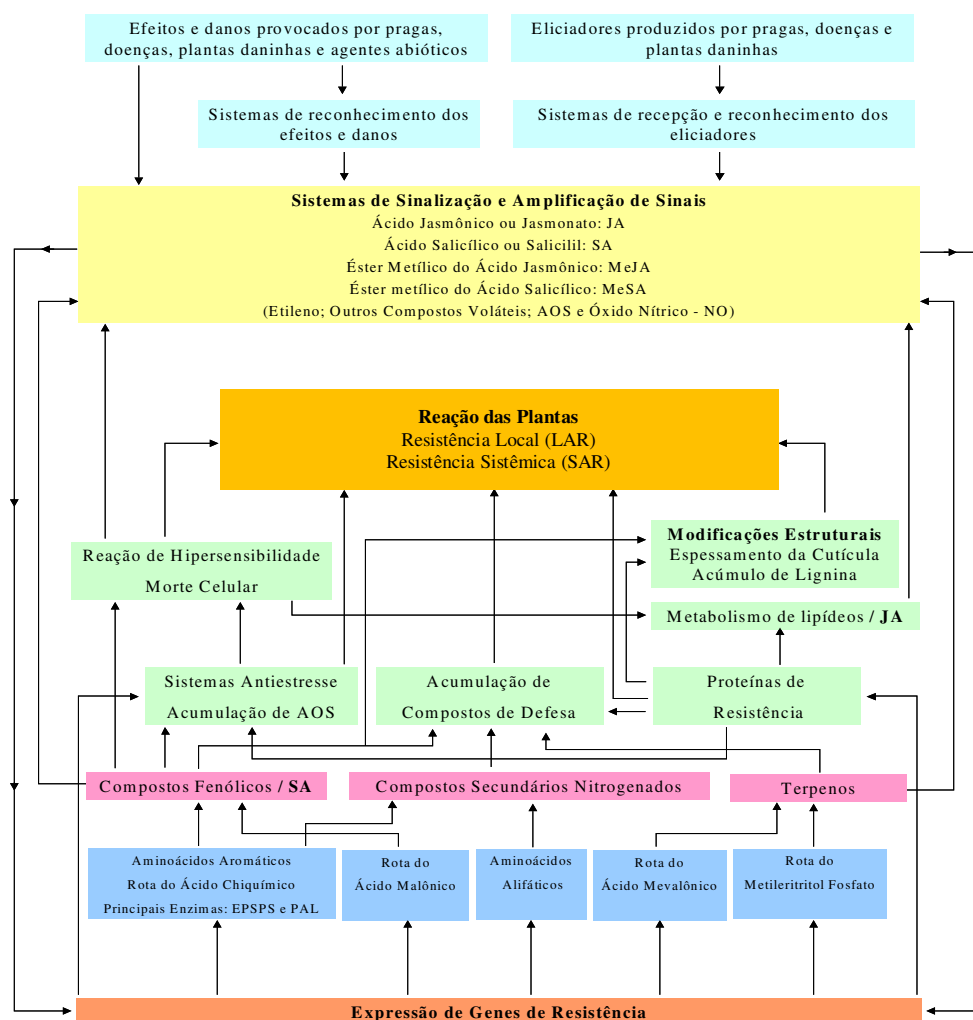
A maioria dos hormônios vegetais são sintetizados endogenamente pelas plantas, porém devido às condições climáticas e ambientais adversas, essa produção nem sempre é satisfatória, uma vez que estes compostos podem ser ativados somente durante uma determinada fase de desenvolvimento da planta, numa determinada estação do ano ou ainda sob condição de estresse causado por fatores bióticos ou abióticos (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Isso geralmente é devido ao fato da produção ser controlada de maneira específica no tecido, ou seja, via rotas bioquímicas que são ativadas por estimuladores.

Os estimuladores são compostos ou tratamentos que induzem as plantas a produzirem mecanismos naturais de defesa, e seu efeito depende de fatores tais como a concentração do estimulador, o estágio de crescimento da cultura no momento da estimulação, o período de contato da cultura com o estimulador e o tempo de estimulação (LOURENÇO, 2003). Eles estão divididos em duas classes: os de origem não biológica, denominados agentes abióticos, e os de origem biológica, ou agentes bióticos (BHAGWATH; HJORTSO, 2000).

Os efeitos e danos provocados por esses agentes são reconhecidos pelas plantas que acionam sistemas de sinalização e amplificação de sinais. Os sistemas sinalizadores conhecidos até o momento ativam genes de resistência, promovendo reações genéricas ou específicas nas plantas. Após a detecção do estresse ou do agente causal, várias rotas metabólicas podem ser ativadas ou inibidas nas plantas, modificando toda a síntese e acumulação de compostos. Na Figura 1 encontra-se um esquema resumido das informações disponíveis sobre os sistemas de reação ou defesa das plantas (VELINI et al., 2009).

O AS e o AJ estão envolvidos na regulação das respostas de defesa e sinalização das plantas frente a patógenos e estresses abióticos (YASUDA et al., 2008). As vias de sinalização desses hormônios vegetais não são isoladas, mas interligados por

uma complexa rede que envolve várias respostas de defesa e processos de desenvolvimento (MARTÍN, 2009).



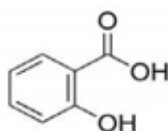
**Figura 1.** Esquema resumido dos sistemas de reação ou defesa das plantas. Fonte: Velini et al., 2009.

### 2.3.1 Ácido salicílico e seus derivados

O AS pertence ao grupo bastante diverso dos compostos fenólicos, usualmente definidos como substâncias com um anel aromático ligado a um grupo hidroxil ou ao seu derivado funcional (Figura 2) (COLLI, 2008). É considerado um hormônio

vegetal devido a sua implicação na regulação da planta, atuando como importante indutor de diversos processos fisiológicos, incluindo a fotossíntese. Segundo Velini et al. (2009), é um composto sinalizador e amplificador de sinais, que induz a expressão de genes de resistência nas plantas.

Grande parte dos compostos de carbono das plantas deriva da via de síntese do ácido chiquímico que gera uma grande variedade de aminoácidos aromáticos precursores da lignina, considerada um constituinte estável e abundante da madeira. A via do ácido chíquimico em seu princípio forma o ácido corísmico que é um intermediário comum para a síntese do triptofano, fenilalanina, tirosina e muitos outros compostos aromáticos, como o AS (VELINI et al., 2009; MARTÍN, 2009).



**Figura 2.** Estrutura química do ácido salicílico.

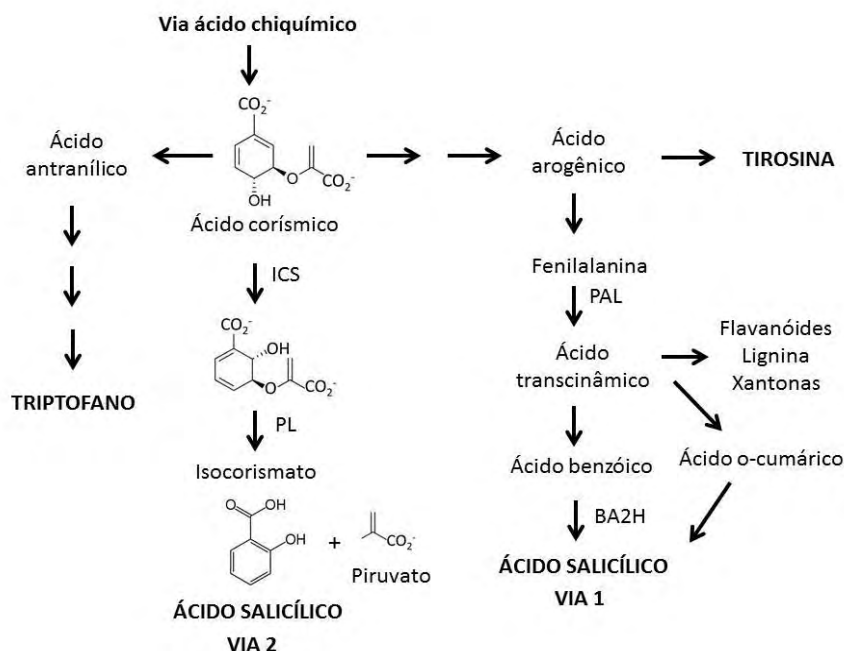
Para a síntese do AS em plantas foram propostas duas vias, conforme mostra a Figura 3. A primeira indica a via fenilalanina→ácido trans-cinâmico→ácido benzóico→ácido salicílico (MÉTRAUX, 2002), e a segunda, descoberta mais recentemente, aponta a atividade da via do ácido corísmico→isocorismato→ácido salicílico (WILDERMUTH et al., 2001). Ambas as vias diferem em sua localização na célula, enquanto a primeira envolve cloroplastos e peroxissomos, a segunda é essencialmente cloroplástica (RASKIN, 1992 apud MARTÍN, 2009).

O AS e o metil salicilato (MeS) são compostos sinalizadores associados à síntese de compostos fenólicos. Estes são capazes de induzir a síntese deles próprios, atuando, também, como amplificadores de sinais. Park et al. (2007) identificou o MeS como a forma móvel do AS, que resulta da conversão do AS pela enzima AS metil transferase no local da sua síntese. Como o MeS é volátil, pode participar na sinalização entre as plantas vizinhas (SHULAEV et al., 1997), atravessando os diferentes tecidos,



sendo hidrolisado a AS nas células alvo pela atividade da proteína 2 ligante de AS (SABP2) (PARK et al., 2007).

O AS está prioritariamente envolvido à resistência de doenças provocadas por patógenos biotróficos, contudo o crescimento de plantas associado à resistência a doenças não pode ser analisado de modo reducionista, considerando-se que a síntese de AS e a indução de genes de resistência por este composto será sempre efetiva e benéfica (VELINI et al., 2009).



**Figura 3.** Biossíntese do ácido salicílico em plantas. As abreviaturas das enzimas se referem a: isocorismato sintase (ICS), isocorismato piruvato liase (PL), fenil amônia liase (PAL) e ácido benzóico 2-hidrolase (BA2H). Fonte: Martín, 2009.

Os resultados obtidos nos últimos anos mostram que o AS pode ser um composto promissor na redução da sensibilidade dos cultivos aos estresses abióticos, visto que em determinadas condições atenua os efeitos adversos produzidos por distintos fatores ambientais estressantes, como a luz ultravioleta (MAHDAVIAN et al., 2008), alta

temperatura (CHAKRABORTY; TONGDEN, 2005), deficiência hídrica (MARDANI et al., 2012) e salinidade (YILDIRIM et al., 2008).

O AS desempenha um papel fundamental na tolerância ao estresse hídrico e interesses consideráveis têm sido focados neste ácido, devido à sua capacidade de induzir efeitos de proteção em plantas submetidas ao estresse por escassez de água (AZOOZ; YOUSSEF, 2010). Neste sentido, a aplicação exógena de AS tem sido testada em diferentes cultivos agrícolas com a finalidade de investigar a capacidade deste em atenuar os efeitos adversos causados pela deficiência hídrica, a exemplo das pesquisas desenvolvidas por Singh e Usha (2003) e Horváth et al. (2007) em trigo, Hussain et al. (2008) em girassol, Carvalho et al. (2007) em calêndula, Mardani et al. (2012) em pepino e Durães (2006) em feijão.

O efeito da aplicação exógena de AS muitas vezes pode ter um resultado contraditório, geralmente a deficiência ou o alto nível de AS aumenta a susceptibilidade da planta ao estresse, contudo aplicações exógenas entre 0,1 e 0,5 mM são concentrações ótimas que geralmente melhoram a tolerância; porém, devem ser estudados os tipos de plantas e o estágio de crescimento do cultivo (YUAN; LIN, 2008). Esse efeito duplo, de deficiência ou alto nível de AS, provoca um estresse oxidativo transitório em plantas e aumenta a capacidade antioxidante destas (BORSANI et al., 2001). O estresse é devido principalmente ao incremento do  $H_2O_2$  (HARFOUCHE et al., 2008), favorecido pela inibição de enzimas que o detoxificam (CAT e APX) (PALMA et al., 2009), e pela ativação enzima superóxido dismutase (SOD) (AZEVEDO et al., 2004).

O estímulo da síntese endógena ou a aplicação exógena de AS, pode agir como indutor de tolerância aos diferentes estresses, e conforme citado anteriormente, elevar ou regular a atividade de enzimas de desintoxicação celular, como peroxidases e superóxido-dismutases, que estão especialmente envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados (CARVALHO et al., 2007).

A aplicação do AS pode inibir a germinação e o crescimento da planta, interferir na absorção das raízes, reduzir a transpiração e causar abscisão das folhas, bem como alterar o transporte de íons, induzindo uma rápida despolarização das membranas, ocasionando um colapso no potencial eletroquímico (COLLI, 2008). No entanto, em alguns trabalhos foi observado que o pré-tratamento com AS em plantas de trigo ativa a germinação de sementes, o crescimento das plantas e a atividade mitótica nos ápices radicais (SHAKIROVA et al., 2003) e favorece o aumento do número de folhas

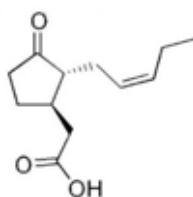
(HAYAT et al., 2005), em mudas de plantas ornamentais estimula a produção e diferenciação de raízes (SINGH, 1993), enquanto que em cevada, Pancheva et al. (1996) observaram um atraso na emergência das mesmas.

De acordo o exposto, é importante o conhecimento da interação ou mudança do balanço hormonal induzido pelo AS na obtenção de respostas fisiológicas e de defesa na planta, pois apesar de ser aceita a função do AS na defesa do vegetal, o seu papel central ainda não é completamente esclarecido (GRANT; LAMB, 2006; MYSORE, 2008).

### 2.3.2 Ácido jasmônico e seus derivados

O AJ é encontrado em muitas espécies vegetais e está envolvido em diversas funções nas plantas, mediando eventos nas células, tais como respostas de defesa, floração e senescência por meio de sinais intracelulares e da expressão de um grande número de genes que parecem estar regulados por ele (ZIMILA, 2011), incluso no processo de tradução de sinais que regulam os genes de defesa das plantas (LOURENÇO, 2003).

É um óleo amarelo viscoso, solúvel em acetato de etil, clorofórmio, etanol, metanol, acetona e éter, e pouco solúvel em água. Sua fórmula é  $C_{12}H_{18}O_3$  e a estrutura química está apresentada na Figura 4.



**Figura 4.** Estrutura química do ácido jasmônico.

A rota bioquímica do AJ deriva do ácido linoleico que pode ser convertido em ácido ciclopentanona 12-oxofitodienóico (12-oxo-PDA), através de peroxidação mediada pela enzima lipoxigenase, seguida da ação do aleno óxido sintase e

aleno óxido ciclase. A 12-oxo-PDA é convertida em AJ através de redução e de tripla  $\beta$ -oxidação (VICK; ZIMMERMAN, 1984).

A presença de ácido linolênico é fundamental para que ocorra a síntese de AJ, de modo que plantas mais ricas em ácido linolênico provavelmente apresentarão maiores níveis de eficiência do sistema sinalizador fundamentado no AJ com reflexos na tolerância aos estresses (VELINI et al., 2009).

Os jasmonatos são produzidos a partir de estímulos externos ou de genes de expressão e estão presentes com maior atividade nos tecidos em crescimento. Geralmente, encontram-se presente nas plantas em concentrações menores que 10  $\mu$ M, porém, seu nível pode variar em função do tecido, do período de desenvolvimento e do estímulo externo (MASON et al., 1992). Os maiores níveis de AJ e MeJ são encontrados nos tecidos reprodutivos, flores e frutos, sendo os menores níveis encontrados nas raízes e folhas maduras. Contudo, em casos de injúrias, podem se mover rapidamente nas plantas, tanto no estado líquido como no gasoso, estimulando respostas defensivas na própria planta bem como em plantas vizinhas (FARMER; RYAN, 1990).

A atividade biológica dos hormônios vegetais está determinada pelo efeito fisiológico que provocam nas plantas, seja inibição ou estimulação de alguma função. A aplicação exógena dos jasmonatos nas plantas produz efeitos muito variados, dentre eles: inibe o alongamento de raízes, a germinação e o crescimento de sementes, promove a biossíntese de etileno, a degradação da clorofila e o fechamento dos estômatos em condições de estresse e aumenta a resistência das plantas a infecções por patógenos (SANCHEZ, 2008).

Os jasmonatos estão envolvidos na indução da expressão da lipoxigenase, a qual está envolvida na biossíntese do AJ. A indução da lipoxigenase via aplicação de jasmonatos, pode fazer com que uma planta suscetível suporte mais os ataques de patógenos ou, então, aumente sua capacidade de sintetizar outros derivados de compostos lipídicos usados em sua defesa. Baixas concentrações de jasmonatos podem induzir a produção de inibidores de proteinases e estimular a biossíntese de flavonóides e de sesquiterpenóides, entre outras substâncias (CREELMAN; MULLET, 1997).

A atividade do MeJ em plantas é altamente dependente da sua concentração. Em baixa concentração (1 a 10  $\mu$ M) nos tecidos atua na indução da expressão gênica, relacionada com a defesa da planta, sendo que em concentrações altas

(acima de 50  $\mu\text{M}$ ) provoca senescência, induzindo a morte celular (MASON; MULLET, 1990 apud MELLO, 2009).

Foi observado efeito positivo no aumento da produção de antocianinas em cultura de células após estimulação com AJ e MeJ (ZHANG et al, 2002) e de taxanos após estimulação com MeJ ou metil dihidro jasmonato (MeDHJ) (DONG; ZHONG, 2001). O MeJ pode ser um importante sinalizador de longa distância induzindo a acumulação de AS em tecidos não afetados por patógenos (SHULAEV et al., 1997).

Weidhase et al. (1987 apud SANCHEZ, 2008) encontraram em folhas de aveia tratadas com soluções de AJ e MeJ a formação de proteínas que não estavam presentes em folhas tratadas apenas com água destilada. Estes compostos foram chamados de proteínas induzidas por jasmonatos que, segundo Wasternack (2002), são proteínas que intervêm nas respostas contra o ataque de fungos, estresses ambientais, no desenvolvimento das plantas, entre outros.

## 2.4 Fosfito de potássio

O fosfito ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) é obtido da neutralização do ácido fosforoso ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ) por uma base (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de amônio), sendo rapidamente absorvido pela planta e translocado pelo xilema e posteriormente pelo floema. Devido ao seu alto grau de solubilidade e mobilidade, possui caráter sistêmico, permitindo ser aplicado de diversas formas como pulverização foliar, pincelamento ou imersão. Na reação com hidróxido de potássio (KOH), tem-se a formação do fosfito de potássio (MENEGHETTI, 2009).

Os fosfitos têm sido utilizados nos cultivos agrícolas, inclusive em cultivos florestais, devido às inúmeras vantagens particulares do produto, como o baixo custo relativo da matéria-prima, melhoria do estado nutricional das plantas, sobretudo nos estádios de maior aumento da atividade metabólica quando a aplicação do produto representaria um fornecimento suplementar de nutrientes, devido à absorção mais rápida de fósforo pela planta em comparação com produtos à base de fosfato, equilíbrio nutricional das plantas, dentre outros (NOJOSA et al., 2005).

O potássio não faz parte de nenhum composto orgânico, portanto não desempenha função estrutural na planta. Consiste em um macronutriente que atua na

ativação de enzimas e está envolvido na síntese de proteínas e no acúmulo de aminoácidos, amidas, aminas e nitratos. Reduções na taxa fotossintética por unidade de área foliar e nas taxas de respiração foram verificadas em plantas por conta da carência de potássio. O suprimento inadequado deste nutriente faz com que os estômatos não se abram regularmente, podendo ocorrer menor assimilação de CO<sub>2</sub> nos cloroplastos, diminuindo consequentemente a fotossíntese (SILVEIRA, 2000).

Plantas deficientes em potássio apresentam menor turgor, pequena expansão celular e maior potencial osmótico (MALAVOLTA et al., 1997; MENGEL; KIRKBY, 2001). Outro efeito atribuído ao potássio é que plantas bem nutridas são mais resistentes, em razão da maior retenção de água (SILVEIRA; MALAVOLTA, 2000). Romero (2008) ao estudar eucalipto submetido à fertilização com potássio sob duas condições hídricas (com estresse e sem estresse) observaram maior eficiência no uso da água (EUA) nas plantas submetidas ao estresse, devido provavelmente ao melhor controle na abertura estomática, que permitiu diminuir a perda de água.

Outros trabalhos evidenciam o efeito benéfico do potássio em plantas sob estresse hídrico, a exemplo, Silva et al. (2004a) observaram que em mudas de *Eucalyptus grandis* submetidas a pequeno estresse hídrico, o potássio aplicado foi importante para a redução da perda de água pelas plantas. Igualmente, os resultados obtidos por Teixeira et al. (1995) mostraram que o maior conteúdo de potássio em Latossolo foi importante para a manutenção do turgor em espécies e híbridos de *Eucalyptus*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

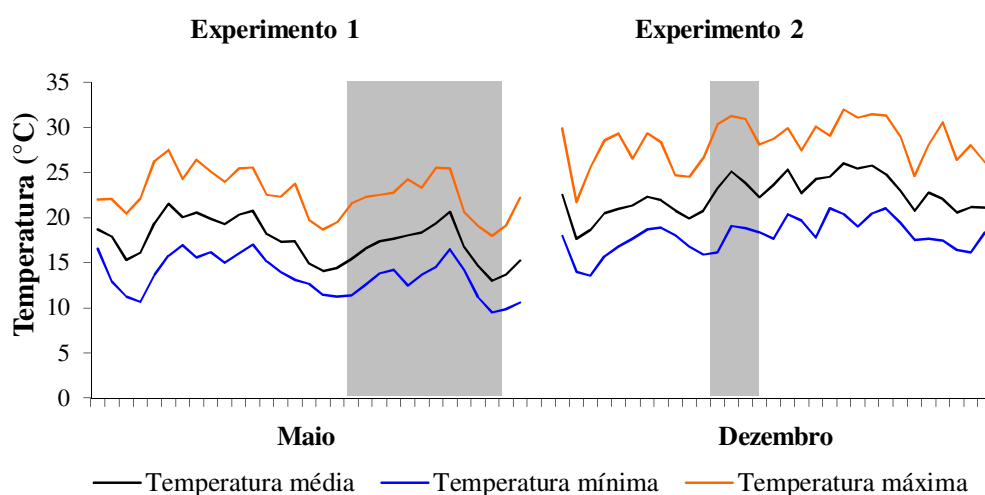
#### 3.1 Condução dos experimentos

A pesquisa compreendeu dois experimentos conduzidos em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), pertencente ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, localizada no município de Botucatu (SP) com as coordenadas geográficas 22°51' 00.09"S e 48° 25' 25.89"W e altitude de 786 m. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é definido como Cwa: clima temperado quente (mesotérmico) (CUNHA et al., 2006).

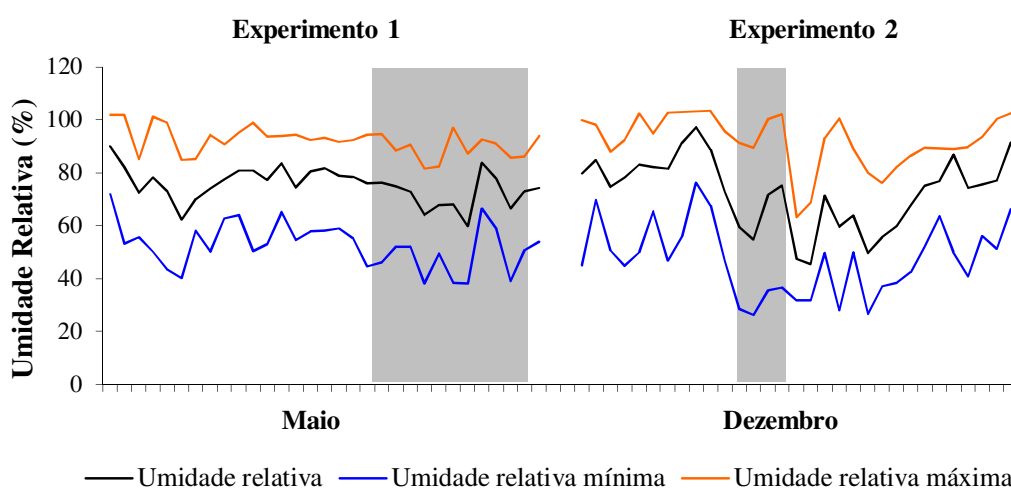
O primeiro experimento foi realizado no período de março a maio e o segundo no período de outubro a dezembro do ano de 2011. Os dados de temperatura e umidade relativa do período em que foi estabelecida a deficiência hídrica às plantas encontram-se apresentados nas Figuras 5 e 6, respectivamente, e podem auxiliar na compreensão dos resultados obtidos durante as avaliações fisiológicas.

Ambos foram realizados utilizando delineamento experimental inteiramente casualizado, com nove tratamentos e quatro repetições, totalizando 36 parcelas experimentais. Cada parcela experimental foi composta por um vaso plástico contendo 5 litros de solo, no qual foi transplantada uma muda no estágio de 3 a 4 pares de folhas do eucalipto híbrido das espécies *E. grandis* vs. *E. urophylla*, cedidas pela empresa Duratex S/A, Lençóis Paulista - SP.

Para o preenchimento dos vasos foi utilizado solo de textura média, corrigido com a adição de calcário e de fertilizantes com nitrogênio, fósforo e potássio em quantidades determinadas de acordo com a análise química de fertilidade do solo (Tabela 1).



**Figura 5.** Temperaturas média, máxima e mínima durante os períodos de deficiência hídrica (áreas em cinza) para o experimento 1 (Maio) e o experimento 2 (Dezembro) no ano de 2011. Botucatu, SP.



**Figura 6.** Umidades relativas média, máxima e mínima durante os períodos de deficiência hídrica (áreas em cinza) para o experimento 1 (Maio) e o experimento 2 (Dezembro) no ano de 2011. Botucatu, SP.



**Tabela 1.** Características físico-químicas do solo utilizado nos experimentos. Botucatu-SP.

pH	M.O.	P <sub>resina</sub>	Al <sup>3</sup>	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V %	S
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>		
4	21	1	13	70	0,2	4	1	5	75	7	14
Areia total			Argila			Silte			Textura do solo		
g kg <sup>-1</sup>			g kg <sup>-1</sup>			g kg <sup>-1</sup>					
654			305			41			Média		

Após o transplante, as plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas regularmente, conforme a necessidade. Os tratamentos (Tabela 2) foram aplicados aproximadamente 45 dias depois do transplântio, quando as plantas apresentavam em média 60 cm de altura e estavam bem aclimatadas. A aplicação foi realizada via pulverização foliar, utilizando um pulverizador manual pressurizado a CO<sub>2</sub> operando à pressão constante e mantido a uma distância de 0,2 m das plantas (Figura 7).

Para a aplicação, as plantas de cada tratamento foram dispostas em 1,0 m<sup>2</sup> e a pulverização foi realizada em toda parte aérea utilizando 50 mL de solução com a dose específica de cada composto. As concentrações utilizadas dos compostos nas soluções foram calculadas com base no peso molecular, e às soluções foi adicionado o espalhante adesivo não iônico Aterbane\* BR na concentração de 0,5% (v/v).

A irrigação foi suspensa sete dias após a aplicação dos tratamentos. Foram adotados dois tratamentos testemunhas, ambos sem aplicação de compostos, sendo um deles submetido à deficiência hídrica e o outro em condições normais de irrigação.



**Figura 7.** Pulverizador manual pressurizado utilizado para a aplicação dos tratamentos (A) e aplicação dos compostos nas mudas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* (B). Botucatu – SP, 2011.

**Tabela 2.** Tratamentos aplicados em mudas de *E. grandis* vs. *E. urophylla*. Botucatu - SP, 2013.

Tratamentos		Doses	
		Experimento I	Experimento II
Teste + CI	Testemunha com irrigação	-	-
Teste + SI	Testemunha sem irrigação	-	-
AS + SI	Ácido Salicílico sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	200 g ha <sup>-1</sup>
MeS + SI	Metil salicilato sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	200 g ha <sup>-1</sup>
AJ + SI	Ácido jasmônico sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	1000 g ha <sup>-1</sup>
MeJ + SI	Metil jasmonato sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	1000 g ha <sup>-1</sup>
ADHJ + SI	Ácido dihidro jasmônico sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	1000 g ha <sup>-1</sup>
MeDHJ + SI	Metil dihidro jasmonato sem irrigação	1000 g ha <sup>-1</sup>	1000 g ha <sup>-1</sup>
FOSF + SI	Fosfito de potássio* sem irrigação	5 L p.c. ha <sup>-1</sup>	5 L p.c. ha <sup>-1</sup>

\*Produto comercial: Fosway. CI – com irrigação; SI – sem irrigação.

### 3.2 Variáveis avaliadas

As variáveis utilizadas para avaliar o efeito da aplicação dos reguladores vegetais e do fosfito de potássio nas plantas submetidas à deficiência hídrica, bem como a metodologia aplicada, estão descritas nos tópicos seguintes.

#### 3.2.1 Avaliação da taxa de transpiração

Aos sete dias da aplicação dos tratamentos, as plantas foram submetidas à deficiência hídrica. Neste dia, os vasos foram irrigados até que o solo atingisse a capacidade de campo, e posteriormente os vasos foram envoltos por um saco plástico com a finalidade de evitar a perda de água pela evaporação do solo e garantir que o consumo de água fosse apenas pela transpiração das plantas (Figura 8).

A taxa transpiratória foi mensurada pelo consumo de água das plantas, obtida pela pesagem diária de cada um dos vasos. Apenas na testemunha com irrigação, os vasos foram irrigados com a quantidade de água perdida pela transpiração das

plantas, determinada pela diferença entre o peso do vaso no dia específico e o peso inicial (primeiro dia em que foi aplicada a deficiência hídrica).

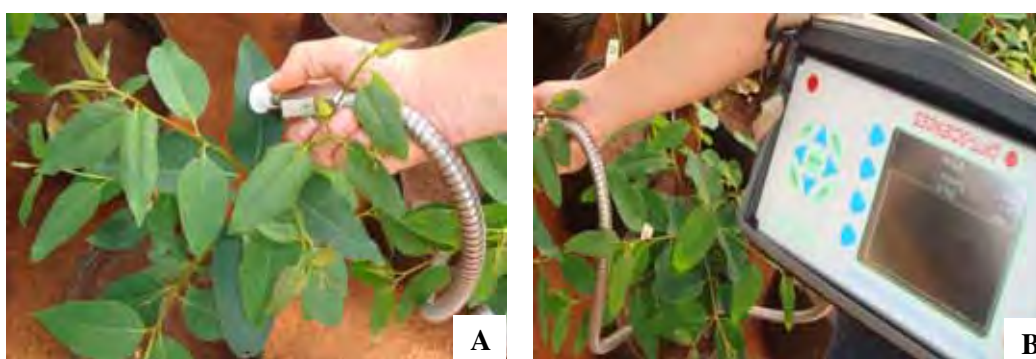
As avaliações de consumo de água foram feitas durante dez dias no primeiro experimento e três dias no segundo experimento. O dia da última avaliação foi determinado pelo dia em que as plantas do tratamento testemunha submetida à deficiência hídrica (Teste + SI) apresentaram características do estresse, como o princípio de murcha das folhas. Neste dia, as folhas das plantas de cada repetição foram levadas a uma câmara de circulação forçada de ar com temperatura de 60°C, até atingirem massa constante. A determinação da biomassa seca das folhas foi feita com o auxílio de uma balança de precisão (0,0001 g). Concomitantemente, dez fragmentos de 2,0 cm<sup>2</sup> do limbo foliar de plantas do tratamento testemunha irrigada (Teste + CI) foram levados à mesma estufa para obtenção da biomassa seca. Obteve-se o valor médio da biomassa seca destes fragmentos de área conhecida e então, por meio da biomassa seca de cada repetição, foi possível estimar a área foliar total das plantas, o que possibilitou a padronização do consumo de água das plantas em cm<sup>3</sup> cm<sup>-2</sup>.



**Figura 8.** Plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* preparadas para a análise da taxa de transpiração. Botucatu - SP, 2011.

### 3.2.2 Taxa de transporte de elétrons (ETR)

O ETR foi monitorado ao final dos experimentos com o uso de um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p - Opti-Sciences) realizando-se leituras na porção mediana das folhas (Figura 9), às nove horas da manhã.



**Figura 9.** Detalhe da leitura do ETR em folhas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* (A) com o fluorômetro portátil OS5p (B). Botucatu - SP, 2011.

Para leitura do ETR utilizou-se o protocolo Yield otimizado para um estado da fotossíntese adaptado à luz, previamente ajustado com um PAR (Radiação Fotossinteticamente Ativa) de 500 Mols elétrons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme descrito por Araldi et al. (2011).

O fluorômetro calcula automaticamente o ETR ( $\mu\text{Mols elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) =  $(Y) \cdot (\text{PAR}) \cdot (0,84) \cdot (0,5)$ , onde é equivalente a: (produção de *quantum* do FSII) x (medidas da radiação fotossinteticamente ativa em  $\mu\text{Mols elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) x (coeficiente de absorção da folha) x (fração de luz absorvida pelo complexo antena do FSII) (ARALDI et al., 2011).

Os valores de ETR foram expressos em porcentagem do valor médio da testemunha irrigada.

### 3.2.3 Quantificação do teor de prolina foliar

A quantificação do teor de prolina nas folhas das plantas de eucalipto foi determinada por cromatografia líquida e espectrometria de massas. O método analítico da quantificação foi desenvolvido no Laboratório de Cromatografia do NUPAM, utilizando um sistema LC-MS/MS composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, que combina análise *ultra-rápida* e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados; equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (que permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems) (Figura 10). O padrão analítico do composto testado apresentou grau de pureza de 99%.

As condições cromatográficas utilizadas para quantificação do composto no modo de ionização positivo estão apresentadas na Tabela 3.

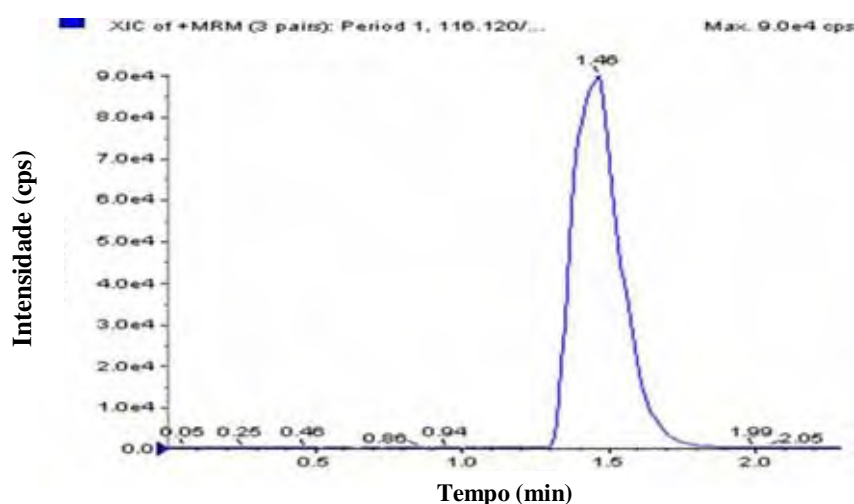


**Figura 10.** Cromatógrafo Líquido (Proeminence UFLC) acoplado ao espectrômetro de massas (3200 Q TRAP) – LC-MS/MS. Botucatu - SP, 2011.

**Tabela 3.** Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do composto no modo de ionização positivo. Botucatu - SP, 2013.

Coluna Analítica	Synergi 2,5 $\mu$ Fusion RP 100 Å
Fase Móvel	Fase A 5mM acetato de amônio em água Fase B 5mM acetato de amônio em metanol
Gradiente	0 - 2 minutos: 70% Fase A e 30% Fase B
	2 - 5 minutos: 5% Fase A e 95% Fase B
	5 - 8 minutos: 5% Fase A e 95% Fase B
	8 - 10 minutos: 70% Fase A e 30% Fase B
	10 - 12 minutos: 70% Fase A e 30% Fase B
Fluxo	0,4 mL.min <sup>-1</sup>

A massa molecular da prolina é 116,120 e os fragmentos (íons secundários) gerados a partir da molécula foram 70,2; 69,0 e 53,1, sendo o primeiro fragmento (70,2) o utilizado para quantificação da prolina. O tempo de retenção na coluna cromatográfica foi de 1,46 minutos. A Figura 11 representa o cromatograma do padrão analítico, nas condições descritas anteriormente, e a curva analítica e faixa de concentração para o composto analisado encontram-se na Tabela 4.



**Figura 11.** Cromatograma da prolina na concentração de 200 ng mL<sup>-1</sup>. Botucatu - SP, 2013.

**Tabela 4.** Curva analítica e faixas de concentração para o composto analisado. Botucatu - SP, 2013.

Composto	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Intervalo linear (ng mL <sup>-1</sup> )
Prolina	$y = 6,73^3 x + 846$	0,9969	1,56 - 200

Para a extração do composto foram coletadas três folhas de cada planta armazenando-as em freezer à -80°C até o dia da leitura. No dia da leitura, as amostras frescas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e depois pesados 200 mg em balança Shimadzu (AY220) com 0,0001g de precisão. Cada amostra foi acondicionada em tubo “falcon” de 15 mL de capacidade, nos quais foram adicionados 10 mL da fase metanol e água (80:20) para extração da prolina. Esta fase foi previamente testada e escolhida como método de extração padrão para as amostras frescas destes experimentos. Os tubos foram submetidos a banho de ultra-som (Cristófoli Biossegurança) com frequência ultra-sônica de 42 KHz, durante 30 minutos.

Após a extração, todas as amostras foram submetidas à centrifugação a 4000 rpm, durante 10 minutos a 20°C (centrífuga Rotanta 460R). O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro Millex HV (Millipore) 0,45µm, com membrana durapore 13 mm, e acondicionados em vial âmbar 9 mm (Flow Supply), com 2 mL de capacidade, para quantificação por LC-MS/MS.

### 3.2.4 Quantificação dos teores de lipoperóxidos

Os teores de lipoperóxidos foram avaliados no segundo experimento. Para obtenção das amostras, foram coletadas lâminas foliares das plantas (repetições) de cada tratamento, ao término do experimento. Cada amostra coletada foi congelada em nitrogênio líquido para que seu metabolismo não sofresse alterações significativas. As amostras foram pesadas e embaladas em plástico e papel alumínio, devidamente etiquetadas e armazenadas em freezer a -80°C (Figura 12).

Para a quantificação dos teores de lipoperóxidos foi utilizada a técnica descrita por Heath e Packer (1968) citados por Rama Devi e Prasad (1998). Esta

técnica permite quantificar lipoperóxidos através da determinação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação de lipídios.

As amostras de lâminas foliares, foram homogeneizadas em 6 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria (90°C) por 60 minutos, seguido de resfriamento em gelo. O homogeneizado resfriado foi então centrifugado em 10000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 e 600 nm (Figura 12). O coeficiente de extinção molar do malondialdeído ( $155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi utilizado para o cálculo dos teores de lipoperóxidos. Os resultados foram expressos em nmol de lipoperóxidos  $\text{g}^{-1}$  tecido fresco.



**Figura 12.** Procedimentos para quantificação dos teores de lipoperóxidos. Etapas da coleta e armazenamento das amostras (A-D) e preparação da amostra para leitura em espectrofotômetro (E-H). Botucatu - SP, 2011.

### 3.2.5 Teor de umidade das folhas

O teor de umidade das folhas foi estimado nas plantas dos tratamentos testemunha, com e sem irrigação. Ao final dos experimentos, a biomassa fresca foi obtida a partir da pesagem das folhas, que, em seguida, foram acondicionadas em



sacos de papel e levadas à estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 60°C. Após seis dias, o material seco foi pesado em balança de precisão (0,0001 g) para determinação da biomassa seca.

O teor de umidade das folhas foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$TU = \frac{(BF - BS)}{BF} \cdot 100$$

Sendo:

TU – teor de umidade, %

BF – biomassa fresca, g

BS – biomassa seca, g

### 3.3 Análise dos resultados

Os dados de ETR foram expressos em porcentagem da testemunha irrigada (Teste + CI) e os dados de consumo de água foram expressos de forma acumulada em cm<sup>3</sup>cm<sup>-2</sup>.

Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e a comparação das médias foi feita pelo do teste t a 5% de probabilidade. Os valores para DMS foram representados nos gráficos.

Foi realizada também análises de correlação entre o teor de prolina foliar e o ETR e entre o teor de umidade das folhas dos tratamentos testemunha e o ETR, para ambos os experimentos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I

Houve diferenças significativas entre os tratamentos aplicados sobre as plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* para as variáveis taxa de transporte de elétrons (ETR) e teor de prolina foliar (Tabela 5).

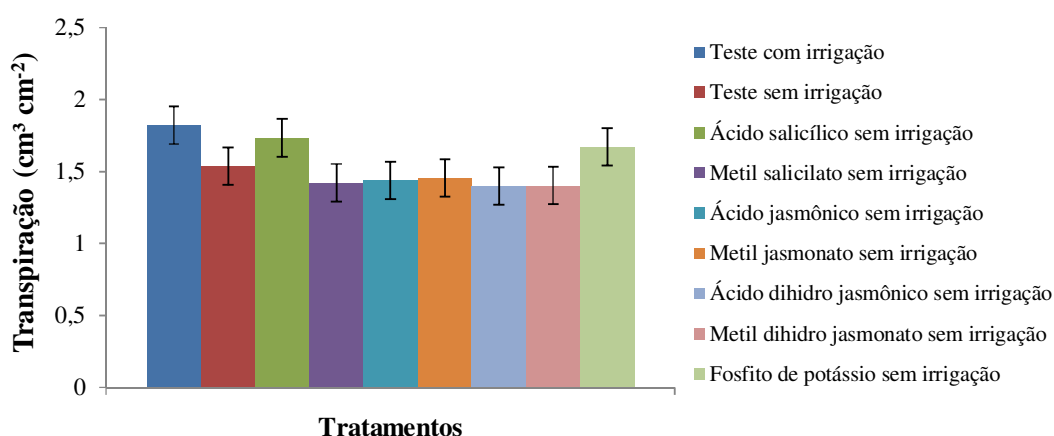
Tanto na Tabela 5 como na Figura 13, é possível notar que a taxa de transpiração das plantas submetidas à deficiência hídrica foi reduzida em relação às plantas do tratamento irrigado (Teste + CI), com exceção das plantas tratadas com o AS e o fosfito de potássio, que não diferiram significativamente da testemunha irrigada. Pereira (2006), Garcia (2012) e Fernandes (2012) também estudando o híbrido *E. grandis* vs. *E. urophylla* observaram reduções na taxa transpiratória das plantas quando em condições de estresse por déficit hídrico. Lima et al. (2003) estudando cinco espécies de *Eucalyptus* e Silva et al. (2004a) em estudo com mudas de *E. grandis* observaram que o estresse hídrico influenciou na transpiração, de modo que as mudas mais adaptadas ao estresse perderam menos água do que as menos adaptadas.

As plantas dos tratamentos com o MeS e os jasmonatos apresentaram as maiores reduções na transpiração (Figura 13), mostrando que a aplicação destes compostos pode ter interferido na percepção dos sinais de estresse, que resultou em maior eficiência no fechamento estomático e na redução da taxa de transpiração.

**Tabela 5.** Médias das variáveis avaliadas no primeiro experimento em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013.

Tratamentos	Transpiração (cm <sup>3</sup> cm <sup>-2</sup> )	ETR (% da Teste+CI)	Prolina (µg g <sup>-1</sup> peso fresco)
Teste + CI	1,82 a	100,00 a	9,35 bc
Teste + SI	1,54 b	65,28 c	12,74 ab
AS + SI	1,73 ab	98,93 a	6,64 c
MeS + SI	1,42 b	61,40 c	8,84 bc
AJ + SI	1,44 b	72,55 bc	13,27 ab
MeJ + SI	1,46 b	79,08 b	8,70 bc
ADHJ + SI	1,40 b	71,02 bc	16,05 a
MeDHJ + SI	1,40 b	82,26 b	10,47 b
FOSF + SI	1,67 ab	99,35 a	9,31 bc
F <sub>c</sub>	1,53	6,38**	2,73*
D.M.S.	0,26	12,27	3,59
C.V. (%)	16,66	14,75	33,05

\*\* e \* significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. D.M.S. - Diferença mínima significativa do teste t ( $\alpha = 5\%$ ); C.V. - Coeficiente de variação. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste t, ao nível de 5% de significância.

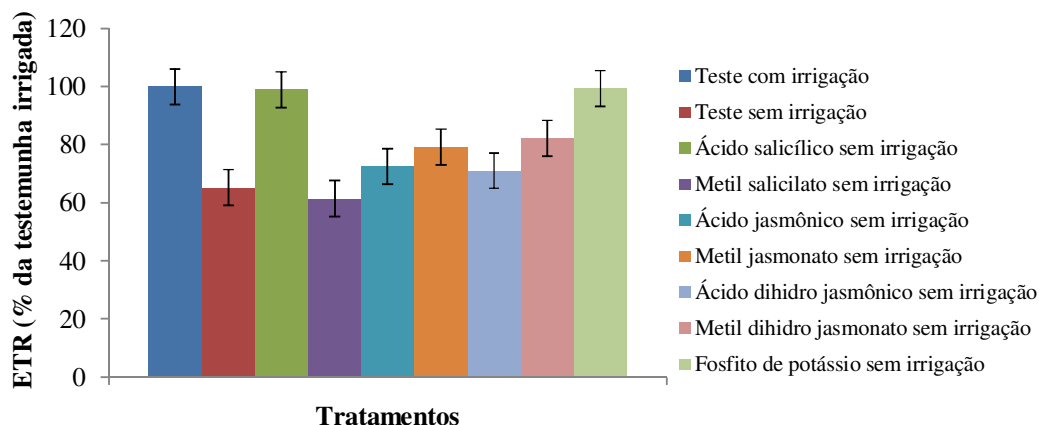


**Figura 13.** Médias da taxa de transpiração em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Com exceção das plantas dos tratamentos com o AS e o fosfito de potássio, todos os tratamentos sob deficiência hídrica apresentaram reduções significativas de ETR em relação à testemunha irrigada (Figura 14). Outros autores obtiveram resultados semelhantes no estudo de plantas submetidas a estresse por deficiência hídrica. Corroborando com os resultados encontrados, Longui (2007) observou uma tendência significativa de redução do transporte de elétrons (ETR) em espécies de *Eucalyptus* sob deficiência hídrica; Sausen (2007) também verificou redução no ETR de plantas de mamona (*Ricinus communis*) sob severo estresse hídrico; Prados (2007) verificou acentuada redução de ETR em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e caupi (*Vigna unguiculata*) em condição de déficit hídrico e Zucareli (2011) verificou reduções significativas do ETR de plantas de maracujá não irrigadas, mostrando que o estresse hídrico afetou o transporte de elétrons e, conseqüentemente, a fotossíntese nestas plantas. Segundo Kaiser (1987), em condições de deficiência hídrica, parte da inibição da fotossíntese pode ser atribuída a fatores não estomáticos em nível dos cloroplastos, sobretudo causados por problemas no transporte de elétrons.

Em relação ao tratamento testemunha sem irrigação (Teste + SI), os tratamentos que receberam aplicação exógena dos compostos e a imposição da deficiência hídrica, apresentaram ETR estatisticamente iguais ou superiores (Tabela 5 e Figura 14), mostrando que pode haver uma resposta de defesa das plantas tratadas com esses reguladores vegetais e o fosfito de potássio a esta condição desfavorável.

Apesar da deficiência hídrica, as plantas dos tratamentos com AS e fosfito de potássio não diferiram estatisticamente da testemunha irrigada, quanto ao ETR (Figura 14). Isto demonstra que mesmo em condição de estresse hídrico as plantas tratadas com estes compostos permaneceram em pleno funcionamento metabólico com 98,93 e 99,35% de ETR da testemunha com irrigação, respectivamente, ao final do experimento (Tabela 5 e Figura 14). Daneshmand (2010) constatou que o AS foi eficaz em melhorar o desempenho fotossintético de plantas de batata (*Solanum estoloniferum*) sob estresse hídrico e Noreen et al. (2009) verificaram aumentos na capacidade fotossintética de plantas de girassol que receberam aplicação foliar de AS e foram submetidas a estresse salino.

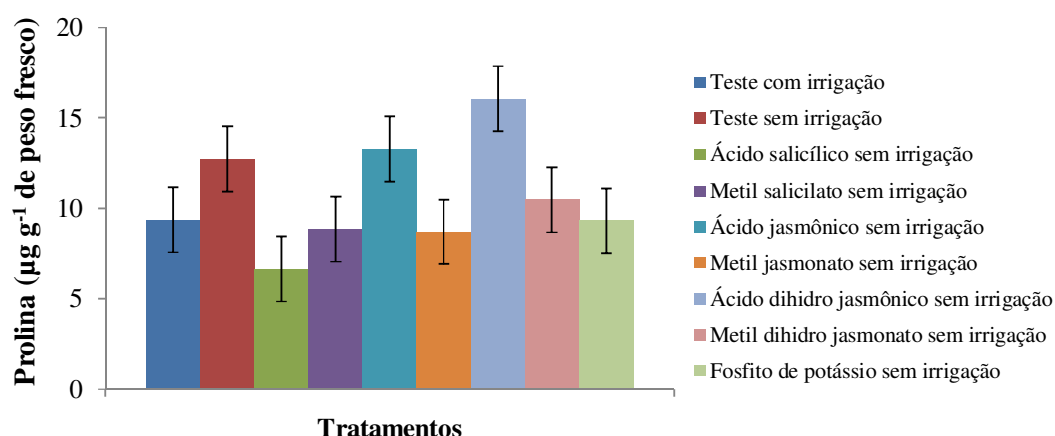


**Figura 14.** Taxa de transporte de elétrons (ETR) em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Segundo Sant'Anna (2009) o fechamento parcial dos estômatos, com consequente redução da taxa de transpiração, é uma conhecida estratégia de tolerância das plantas à deficiência hídrica, mas também tem sido indicado como principal limitante da fotossíntese (CHAVES, 1991; CORNIC, 2000; PEEVA; CORNIC, 2009). Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que apesar da deficiência hídrica e da redução na transpiração, as plantas dos tratamentos com a aplicação dos reguladores vegetais e do fosfito de potássio conseguiram preservar os valores de ETR iguais ou superiores estatisticamente ao valor da testemunha sem irrigação (Tabela 5 e Figura 14). As plantas que receberam a aplicação exógena dos AJ, ADHJ e seus ésteres metílicos (MeJ e MeDHJ) preservaram os valores da ETR com as maiores reduções do consumo de água (Tabela 5). De acordo Sant'Anna (2009) as plantas que conseguem manter a atividade fotossintética em detrimento da perda de água através de vapor, mostram maior eficiência de uso da água, que é a relação entre a fotossíntese e a transpiração.

Nas plantas dos tratamentos testemunhas com e sem irrigação, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias quanto aos teores de prolina foliar, embora as plantas da testemunha sob deficiência hídrica (Teste + SI) tenham apresentado

teor de prolina nas folhas superior à testemunha irrigada (Teste + CI) (Tabela 5 e Figura 15). Outros autores encontraram acréscimos no conteúdo de prolina foliar em plantas de eucalipto submetidas à deficiência hídrica, a exemplo de Moraes (2011) em híbrido de *E. grandis* vs. *E. urophylla* e Merchant et al. (2007) em espécies de *Eucalyptus*. Shvaleva et al. (2005) constataram aumento na concentração de açúcares solúveis e prolina em plantas de *E. globulus* à medida que o estresse hídrico tornou-se mais severo.



**Figura 15.** Médias do teor de prolina foliar em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no primeiro experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

O menor teor de prolina foi observado nas plantas do tratamento com AS, enquanto que as plantas tratadas com AJ e ADHJ induziram o acúmulo de prolina nas folhas (Figura 15). Nos demais tratamentos não houve diferenças significativas entre as médias (Tabela 5), embora as plantas dos tratamentos com a aplicação das formas metílicas dos compostos (MeS, MeJ e MeDHJ) e o fosfito de potássio mesmo sob deficiência hídrica apresentaram leve redução nos teores de prolina foliar em relação à testemunha sem irrigação (Figura 15). Corroborando com estes resultados, Durães (2006)

observou que a aplicação de AS (0,05 mM) ocasionou a redução no acúmulo de prolina em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas à deficiência hídrica e Vieira (2011), também trabalhando com plantas de feijão submetidas à deficiência hídrica, observou decréscimos no teor de prolina foliar à medida que foi elevada a concentração de AS. Martín (2009) observou que a aplicação de AS em plantas de feijão e alfafa submetidas ao estresse salino induziu menor acúmulo de prolina nas folhas em relação às mesmas plantas submetidas ao estresse salino e sem aplicação do AS.

Segundo Brito et al. (2008) a função da prolina na resposta ao estresse hídrico é questionável. Para muitos autores o acúmulo de prolina está associado ao mecanismo protetor em plantas submetidas a condições de estresse, funcionando no ajuste osmótico de folhas com baixo potencial hídrico. Porém, a baixa utilização de prolina durante o estresse também pode contribuir para seu acúmulo. Vários trabalhos têm indicado que a prolina também pode ser um indicador da severidade do estresse, ao invés de estar associada a um mecanismo protetor (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Deste modo, o acúmulo desse aminoácido só seria promovido caso a desidratação celular ultrapasse um limiar de dano à célula, sendo seu acúmulo mais notório nas plantas mais sensíveis.

Isto pode explicar o comportamento das plantas do tratamento com o AS, que apresentaram acentuada redução no teor de prolina foliar mesmo sob deficiência hídrica. Conforme já citado, o AS é um regulador vegetal que induz a expressão de genes de defesa na planta e pode ser um composto promissor na redução da sensibilidade dos cultivos aos estresses, visto que atenua os efeitos adversos produzidos pela deficiência hídrica (MARDANI et al., 2012, AZOOZ; YOUSSEF, 2010). Trabalhos testando o efeito da aplicação exógena de AS em diferentes culturas submetidas à deficiência hídrica apresentaram resultados semelhantes quanto à redução do conteúdo de prolina nas plantas (SINGH; USHA, 2003; HORVÁTH et al., 2007; HUSSAIN et al., 2008; CARVALHO et al., 2007; MARDANI et al., 2012; DURÃES, 2006, VIEIRA, 2011).

Igualmente, a aplicação das formas metálicas dos ácidos (MeS, MeJ e MeDHJ) e do fosfito de potássio em plantas submetidas a deficiência hídrica, podem ter promovido as leves reduções nos teores de prolina foliar observados em relação as plantas do tratamento testemunha sem irrigação (Tabela 5). Evidências sugerem que a aplicação dos jamonatos pode ter relação com a expressão de genes envolvidos na defesa e na sinalização das respostas a estresses hídricos, aumentando a resistência da planta

(KERBAUY, 2008), enquanto que a aplicação do fosfito de potássio melhora o estado nutricional da planta (NOJOSA et al, 2005) e aumenta a resistência em função da maior retenção de água (SILVEIRA; MALAVOLTA, 2000). Alguns trabalhos avaliaram a resposta de espécies de *Eucalyptus* cultivadas sob deficiência hídrica e aplicação de potássio, mostrando efeitos positivos quanto à resistência da planta a esta condição desfavorável. Nos trabalhos realizados por Romero (2008) e Silva et al. (2004a) aplicação de potássio foi importante para a redução da perda de água pelas plantas.

## 4.2 Experimento II

Segundo Vanacker et al (2001) e Horváth et al. (2007) o efeito da aplicação exógena de AS depende de inúmeros fatores, tais como espécie, fase de desenvolvimento, modo de aplicação e a concentração aplicada. Destes fatores, a concentração aplicada merece atenção, pois a deficiência ou o alto nível de AS podem aumentar a susceptibilidade da planta. Neste experimento as doses do AS e do MeS foram reduzidas para 200 g ha<sup>-1</sup> devido aos sintomas de intoxicação observados nas plantas do primeiro experimento. Os sintomas foram notados nas folhas das plantas em forma de pequenas manchas cloróticas e encarquilhamento.

Enquanto no primeiro experimento as plantas apresentaram sintomas do estresse após dez dias da deficiência hídrica, neste experimento os sintomas foram visíveis a partir do terceiro dia da deficiência hídrica. Este fato pode ser explicado pelas diferenças de temperatura e umidade relativa dos diferentes períodos em que foram conduzidos os experimentos. Nas Figuras 5 e 6, podem ser observados os dados de temperatura e umidade relativa, respectivamente, demonstrando que o segundo experimento foi conduzido em condições mais favoráveis à severidade do estresse.

Diferenças significativas foram verificadas entre os tratamentos aplicados sobre as plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* para as variáveis ETR e teor de lipoperóxidos (Tabela 6).

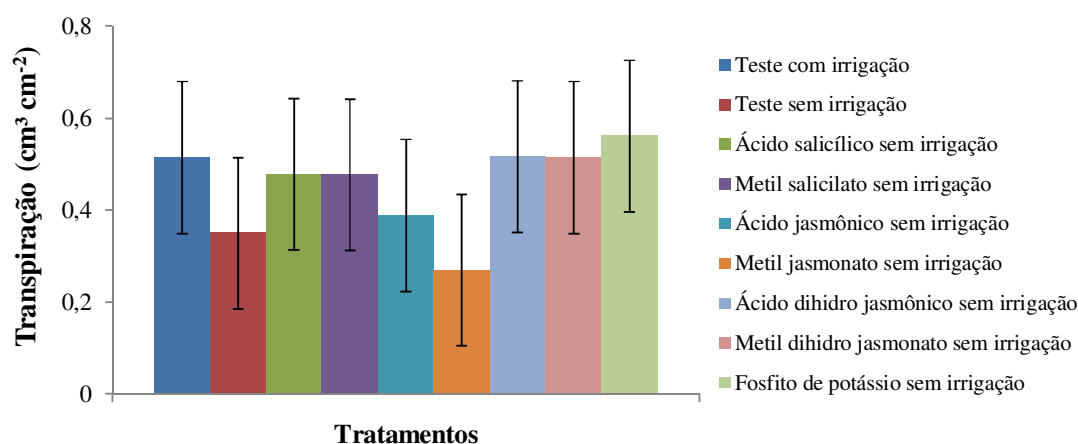


**Tabela 6.** Médias das variáveis avaliadas no segundo experimento em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013.

Tratamentos	Transpiração (cm <sup>3</sup> cm <sup>-2</sup> )	ETR (% da Teste+CI)	Prolina (µg g <sup>-1</sup> )	Lipoperóxidos (nmol g <sup>-1</sup> )
Teste + CI	0,51 a	100,00 a	5,80 b	16,08 b
Teste + SI	0,35 a	63,78 b	15,44 a	37,89 a
AS + SI	0,48 a	84,02 ab	14,26 ab	25,00 b
MeS + SI	0,48 a	96,43 a	6,49 b	20,08 b
AJ + SI	0,39 a	94,65 a	8,43 b	28,23 ab
MeJ + SI	0,27 a	93,63 a	10,06 ab	28,002 ab
ADHJ + SI	0,52 a	92,73 a	11,32 ab	36,26 a
MeDHJ+SI	0,51 a	74,24 b	14,33 ab	36,68 a
FOSF + SI	0,56 a	94,09 a	10,30 ab	25,15 b
F <sub>c</sub>	0,35	1,92*	1,33	1,98*
D.M.S.	0,33	17,68	6,16	11,09
C.V. (%)	71,37	19,55	56,00	38,41

\* significativo a 10% de probabilidade pelo teste de F; D.M.S. - Diferença mínima significativa do teste t ( $\alpha = 5\%$ ); C.V. - Coeficiente de variação. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste t, ao nível de 5% de significância.

Os tratamentos não diferiram significativamente quanto à taxa transpiratória, embora fosse observada leve redução na transpiração das plantas do tratamento testemunha sem irrigação e dos tratamentos com o AJ e o MeJ (Figura 16). De acordo com Kerbaui (2008), a aplicação dos jasmonatos pode interferir na expressão de genes de defesa e na sinalização das respostas à estresses hídricos, aumentando a resistência das plantas. Outros trabalhos com plantas de *Eucalyptus* em ambientes com diferentes condições de disponibilidade de água no solo também verificaram que o déficit hídrico promoveu reduções nos valores da transpiração e da fotossíntese (LIMA et al., 2003; PAVAN, 2003; TATAGIBA et al., 2007).

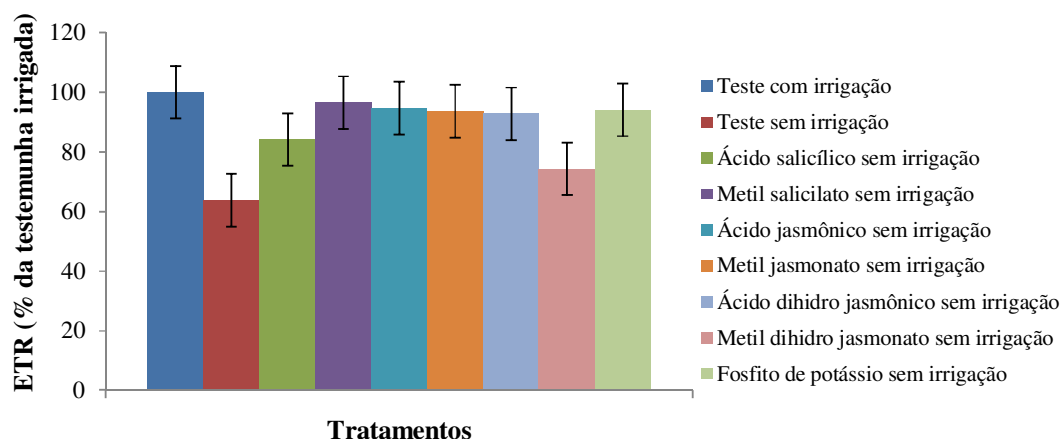


**Figura 16.** Médias da taxa de transpiração em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Houve diferença significativa na taxa de transporte de elétrons (ETR) das plantas dos tratamentos testemunha com e sem irrigação, sendo que as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram redução de aproximadamente 37% na média de ETR em relação à testemunha irrigada. As plantas tratadas com MeDHJ e submetidas à deficiência hídrica, também apresentaram significativa inibição do transporte de elétrons, representado pela redução de aproximadamente 26% do ETR da testemunha irrigada (Figura 17).

Nos demais tratamentos com os reguladores vegetais e o fosfito de potássio, não foram verificadas reduções significativas no ETR, e mesmo em condições de limitada disponibilidade hídrica, as plantas preservaram o ETR estatisticamente iguais à testemunha irrigada (Teste + CI) (Figura 17). Khan et al. (2003) avaliando o efeito da aplicação foliar de AS em plantas de milho e soja observaram aumentos na taxa fotossintética das plantas, enquanto Durães (2006) não observou diferença significativa de ETR em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com e sem aplicação de AS e submetidas ao déficit hídrico. Andrade (2011) verificou redução na fotossíntese líquida de mudas de

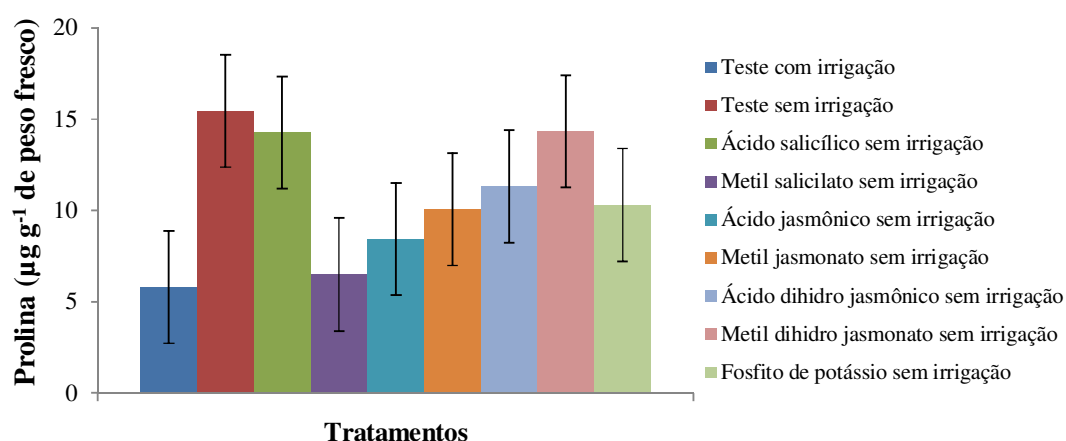
café (*Coffea arabica* L.) submetidas à deficiência hídrica, independentemente do tratamento com potássio.



**Figura 17.** Médias da ETR em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação exógena de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Os teores de prolina foliar diferiram estatisticamente entre os tratamentos testemunha com e sem irrigação, sendo que as plantas submetidas à deficiência hídrica apresentaram acúmulo de prolina quase três vezes maior que na testemunha irrigada (Tabela 6 e Figura 18). Em alguns trabalhos se verifica a associação marcante deste osmólito como indicador da severidade do estresse hídrico e, segundo Nogueira et al. (1998) o aumento do conteúdo de prolina nas folhas é diretamente proporcional à severidade do estresse. Nesta pesquisa, os tratamentos em que foram aplicados os reguladores vegetais e o fosfito de potássio, foi observada redução no teor de prolina foliar em relação à testemunha sem irrigação (Figura 18), mostrando que a aplicação destes compostos pode ter sido atenuante da severidade do estresse a que estavam submetidas as plantas, refletindo na redução da produção e do acúmulo deste aminoácido. Nos

tratamentos com a aplicação de AS e MeDHJ essa redução foi menor e não significativa. Hussain et al. (2008) observaram aumentos nos teores de prolina em plantas de girassol tratadas com AS e sob estresse hídrico, igualmente Hussain et al. (2007) observaram que a aplicação exógena de AS resultou em aumentos na concentração de prolina em plantas de milho. No entanto, Durães (2006) observou redução na síntese/acúmulo de prolina em plantas de feijão variedade ‘Guarumbé’ submetidas a tratamento com AS e a deficiência hídrica.

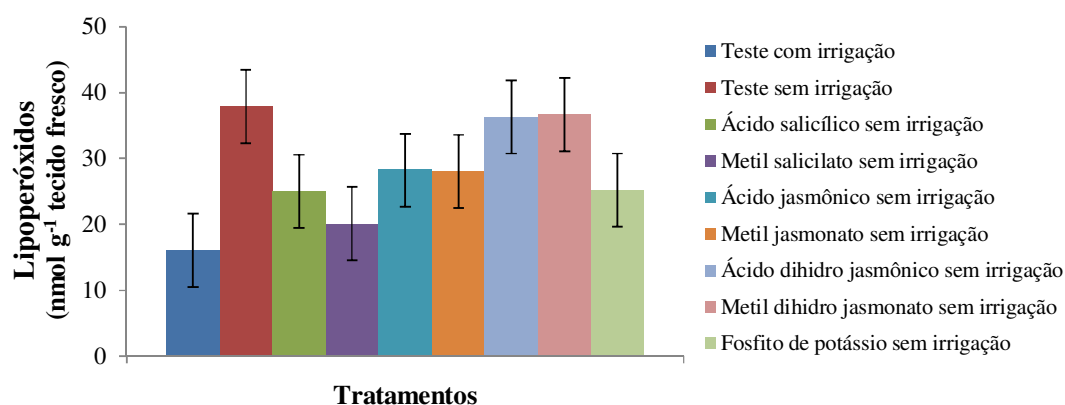


**Figura 18.** Médias do teor de prolina foliar em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Estresses oxidativos são uma consequência comum do estresse hídrico em vegetais e a alteração nos teores de lipoperóxidos é indicador de prevalência de dano oxidativo nos tecidos (CATANEO et al., 2005). Na Figura 19 e na Tabela 6 observa-se que o estresse causado por deficiência hídrica aumentou a peroxidação lipídica nas folhas das plantas submetidas à deficiência hídrica, embora a aplicação dos AS, MeS e do fosfito de potássio induziram a redução deste parâmetro. Martín (2009) observou incremento nos teores de lipoperóxidos nas folhas de plantas de feijão submetidas ao

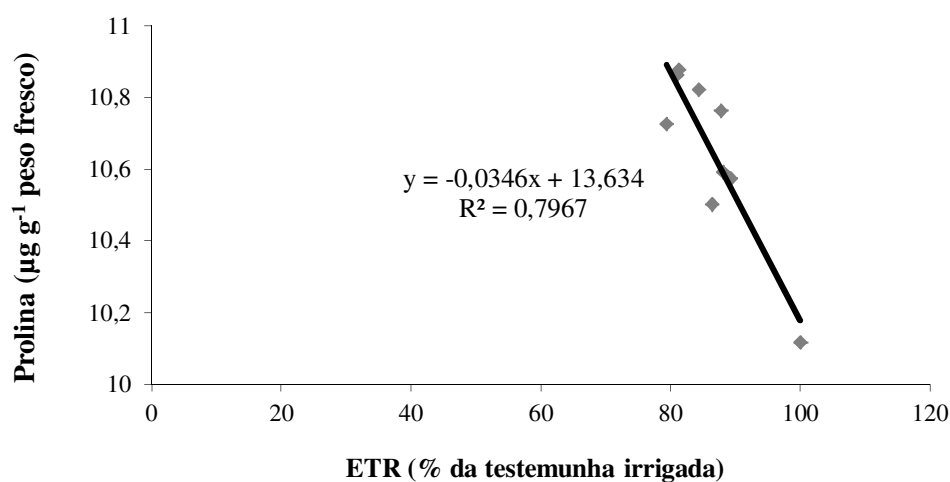
estresse salino, enquanto que as mesmas plantas previamente tratadas com AS apresentaram reduções nos teores de lipoperóxidos. Igualmente Agarwal et al. (2005) observaram decréscimos no nível de peroxidação de lipídeos em plantas de trigo pulverizadas com 1 mM de AS e sob estresse hídrico moderado.

Segundo Xu et al. (2009) o AS está envolvido no desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida (SAR), podendo ativar enzimas antioxidantes em plantas, em resposta a diferentes estresses, o que possivelmente pode ter causado a redução nos teores de lipoperóxidos em plantas sob restrição hídrica e tratadas com os AS e MeS neste experimento.



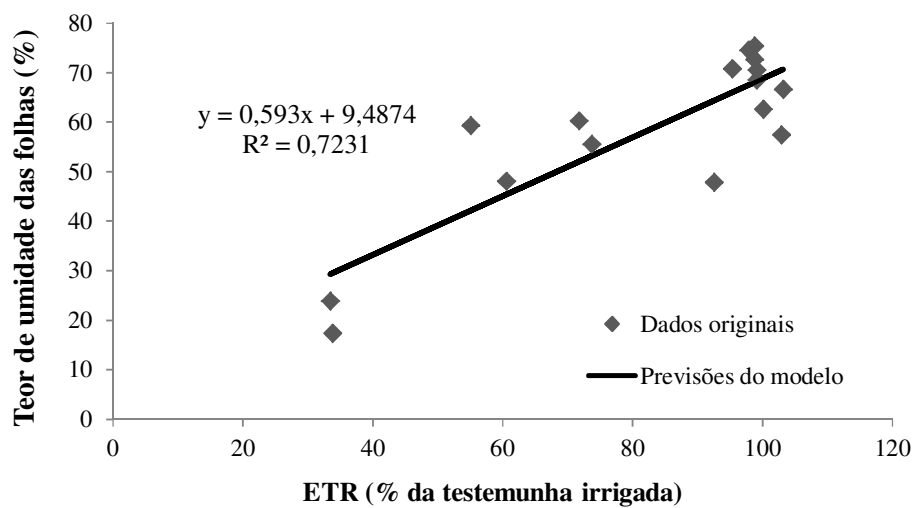
**Figura 19.** Médias dos teores de lipoperóxidos em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio no segundo experimento. As barras indicam a D.M.S. do teste t ( $\alpha = 5\%$ ). Botucatu - SP, 2013.

Foi verificada correlação positiva entre os teores de prolina nas folhas e o ETR em ambos os experimentos (Figura 20). O teor de prolina livre nas plantas é utilizado para diagnosticar plantas suscetíveis ao estresse hídrico, sendo assim, os valores de ETR também poderiam ser considerados como um indicador do estresse hídrico na planta, tendo a vantagem de ser um método de medição rápida e não destrutiva.



**Figura 20.** Correlação entre os teores de prolina foliar e a ETR em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e de fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013.

O teor de umidade das folhas correlaciona-se significativamente e de forma positiva com o ETR. À medida que aumentam os teores de umidade das folhas os valores de ETR também aumentam, indicando que o ETR pode representar uma ferramenta para verificar o estado hídrico das mudas de eucalipto, obtida de modo rápido e não destrutivo. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indica que 72,31% da variação total observada, no experimento, foi explicada pelo modelo. A significância da regressão testada pela análise de variância foi significativa a 5 % (Figura 21).



**Figura 21.** Correlação entre o teor de umidade e o ETR em plantas de *E. grandis* vs. *E. urophylla* submetidas à deficiência hídrica e a aplicação de reguladores vegetais e fosfito de potássio. Botucatu - SP, 2013.

## CONCLUSÕES

- O estresse por deficiência hídrica elevou os teores de prolina e de lipoperóxidos e reduziu a taxa de transporte de elétrons (ETR) nas folhas de *E. grandis* vs. *E. urophylla*;

- Nos tratamentos com a aplicação do AS e do fosfito de potássio houve atenuação dos efeitos do estresse hídrico, sendo que as taxas de transpiração, os valores de ETR e os teores de prolina foliar foram próximos dos verificados no tratamento testemunha com irrigação. Os teores de lipoperóxidos destes tratamentos foram intermediários quando comparados com os teores dos tratamentos com e sem irrigação;

- Nos tratamentos com aplicação do AJ e MeJ houve atenuação dos efeitos do estresse hídrico, sendo que os valores de ETR, os teores de prolina foliar e os teores de lipoperóxidos destes tratamentos foram intermediários quando comparados com os teores dos tratamentos com e sem irrigação;

- A aplicação do AJ e do MeJ atenuou os efeitos do estresse por deficiência hídrica além de reduzir a taxa de transpiração nas plantas;

- Os efeitos do MeS foram menos consistentes em termos de redução do estresse hídrico do que os observados para o AS;

- Os ADHJ e o MeDHJ foram menos eficazes do que o AJ e o MeJ, respectivamente, em termos de mitigar os efeitos do estresse por deficiência hídrica;

- A ETR permite estimar, de modo não destrutivo, o teor de umidade nas folhas de *E. grandis* vs. *E. urophylla*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas – Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011, Brasília, 2012, 150 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2013.

AGARWAL, S. et al. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 9, p. 541-550, 2005.

ALVARENGA, R. C., et al. Efeitos do conteúdo de água no solo e da poda de raízes sobre o crescimento de mudas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 18, n. 2, p. 107-114, 1994.

ALVARENGA, I. C. A. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v.13, especial, p.539-541, 2011.

ANDRADE, M. A. F. de. **Relações hídricas e crescimento de plantas jovens de café sobre diferentes regimes hídricos e doses de N e K**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

ARALDI, R. et al. Efeitos na taxa de transporte de elétrons de plantas daninhas após aplicação de amicarbazone. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 647-653, 2011.

ARALDI, R. **Avaliação da absorção do amicarbazone e intoxicação em cana-de-açúcar e plantas daninhas**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

ARRIEL, E. F. **Divergência genética em *Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. ET Hoffm. (*Euphorbiaceae*)**. 2004. 89 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnologia Florestal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 93-121, 2007.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. Salicylic acid up-regulates the expression of chloroplastic Cu, Zn-superoxide dismutase in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 61, p. 847-850, 2004.

AZOOZ, M. M.; YOUSSEF, M. M. Evaluation of heat shock and salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in hassawi wheat. **American Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 2, p. 56-70, 2010.

BAISAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant and Cell Physiology**, v.35, p.489-495, 1994.

BASSA, A. G. M. C. et al. Misturas de madeira de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e *Pinus taeda* para produção de celulose kraft através do Processo Lo-Solids®. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 75, p. 19-29, 2007.

BECHER, T. W.; FOCK, H. P. The actividade of de nitrate reductase and poll sizes of some amino acids and some sugars in water stressed maize leaves. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 8, p. 267-274, 1986.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotechnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 15, p. 4-8, 2000.

BHAGWATH, S.G.; HJORTSO, M.A. Statistical análisis of elicitation strategies for thiarubrine: A production in hairy root cultures of *Ambrosia artemisiifolia*. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.159-167, 2000.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photo system II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, Berlin, v.102, p.425-432, 1995.

BORSANI, O.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. A. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in arabidopsis seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 126, p. 1024-1030, 2001.

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. Desempenho do setor em 2006 e projeções para 2007, São Paulo, 2008, 8 p. Disponível em :<[http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/anual/desempenho\\_2006.pdf](http://www.bracelpa.org.br/bra/estatisticas/pdf/anual/desempenho_2006.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BRITO, L. K. F. L. et al. Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n. 6, p. 683-690, 2008.

BROOKER, M. H. I.; KLEINIG, D. A. **Field guide to Eucalypts**. 2. ed. Melbourne: Boomings books, 2004. v. 3, 383 p.

BROOKER, M. H. I.; KLEINIG, D. A. **Field guide to Eucalypts**. 3. ed. Melbourne: Boomings books, 2006. v.1, 356 p.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 95-105.

CALBO, M. E. R.; MORAES, J. A. P. V. de. Efeitos da deficiência de água em plantas de *Euterpe oleracea* (açai). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 225-230, 2000.

CAMPOS, M. K. F. et al. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’ citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 242-250, 2011.

CARVALHO, P. R.; MACHADO NETO, N. B.; CUSTÓDIO, C. C. Ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 1, p.114-124, 2007.

CASTRO, D. da S. et al. Concentrações de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas teca (*Tectona grandis* L.f) submetida ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 921-923, 2007.

CATANEO, A.C.; CHAMMA, K. L.; FERREIRA, L. C.; DÉSTRO, G. F. G.; SOUSA, D. C. F. Atividade de Superóxido Dismutase em Plantas de Soja (*Glycine max* L.) Cultivadas Sob Estresse Oxidativo Causado por Herbicida. **Revista Brasileira de Herbicida**, v. 4, n. 2. 2005.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, London, v. 103, p. 551-560, 2009.

CHAKRABORTY, U.; TONGDEN, C. Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermo tolerance in *Cicer arietinum* L. **Current Science**, Columbus, v.89, n. 2, 2005.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. p. 296-302.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 187-188, 2000.

COSTA, E.S; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVEIRA, J.G.; CAMPOSTRINI, E. Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. **Photosynthetica**, Prague, v.41, p.77-82, 2003.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, Califórnia, v.48, p.355-381, 1997.

CUNHA, A. R.; MARTINS, D.; RICARTE, R. M. Atualização da classificação climática para os municípios de Botucatu e São Manuel - SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE METEOROLOGIA, 14., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBMET, 2006. p. 7.

DANESHMAND, F.; ARVIN, M.J.; KALANTARI, K.M. Acetylsalicylic acid ameliorates negative effects of NaCl or osmotic stress in *Solanum stoloniferum* in vitro. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 4, p. 781-784, 2010.

DESTRO, M. V. P. Estresse salino associado à aplicação exógena de espermidina no acúmulo de glicina betaína em guandu. **Bragantia**, Campinas, v. 67, p. 593-597, 2008.

DÍAZ, L. N. P. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. **Revista de Estudios Transdisciplinarios**, Venezuela, v. 1, n. 2, p. 32-55, 2009.

DONG, H. D; ZHONG, J. J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.8, p.145-150, 2001.

DURÃES, M. A. B. **Respostas de duas populações de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas com ácido salicílico e submetidas a estresse hídrico**. 2006. 32 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2006.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 87, p. 7713- 7716, 1990.

FERNANDES, E. T. **Fotossíntese e crescimento inicial de clones de eucalipto sob diferentes regimes hídricos**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

FLEXAS, J.et al. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions. **Functional Plant Biology**, Dordrecht: Kluwer, 2002. p. 461-471.

GARCIA, R. D. **Qualidade das mudas clonais de dois híbridos de eucalipto em função do manejo hídrico**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência Florestal) – Faculdade de Ciência Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.900, p.87-92, 1989.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Plant Biology**, Stuttgart , v. 9, p. 414-420, 2006.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715-725, 1993.

HANSON, A. D.; NELSEN, C. E. TULLEY, E. R. Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 63, p. 518-523, 1979.

HAYAT, S. Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. **Acta Agronomic Hungary**, v. 53, p. 433-437, 2005.

HARFOUCHE, A. L. et al. Salicylic acid induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and endochitinase gene expression but not ethylene biosynthesis in *Castanea sativa* in vitro model system. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 7, p. 734-744, 2008.

HORVÁTH, E. et al. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 3, p. 480-487, 2007.

HUSSAIN, M.M.; BALBAA, L. K.; GABALLAH, M. S. Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 321-328, 2007.

HUSSAIN, M. M. et al. Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 3, p. 193-199, 2008.

ISMAEL, J. J. **Efeitos da fertilização nitrogenada e da umidade do substrato na aclimação e na adaptação no campo de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (HILL ex MAIDEN)**. 2001. 106 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

KAISER, W. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 142-149, 1987.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 485-492, 2003.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2008. p. 452.

KRAUSE, G. H.; WINTER, K. Photoinhibition of photosynthesis in plants growing in natural tropical forest gaps: a chlorophyll fluorescence study. **Bot. Acta**, v. 109, p. 456-462, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2004. 531 p.

LESSENGER, J. E. **Agricultural medicine: A practical guide**. Porterville: Springer, 2006. 541 p.

LEITE, M.L. et al. Variação de prolina em folhas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) submetido a diferentes déficits hídricos. **Revista Biotemas**, v.12, n.1 p.21-33. 2000.

LEVINE, A. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.

LIBERATO, M. A. R. et al. Leaf water potential, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in acariquara seedlings (*Minquartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, p.315-323, 2006.

LIMA, W. P.; JARVIS, P.; RHIZOPOULOU, S. Stomatal responses of *Eucalyptus* species to elevated CO<sub>2</sub> concentration and drought stress. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 231-238, 2003.

LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; COSTA, R. C. L.; SANTOS FILHO, B. G.; CRUZ, F. J. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) walp. under water stress during the vegetative phase. **Asian Journal of Plant Sciences**, Pakistan, v. 7, n. 1, p. 44-49, 2008.

LONGUI, B. M. **Fotossíntese e relações hídricas de espécies de *Eucalyptus* sp. submetidas a diferentes regimes hídricos**. 34 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção vegetal), Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2007.

LOPES, J. L. W. **Produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (Hill ex. Maiden) em diferentes substratos e lâminas de irrigação**. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia-Irrigação e Drenagem) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

LOPES, J. L. W. **Qualidade de mudas clonais do híbrido de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla*, submetidas a diferentes regimes hídricos.** 2008. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Irrigação e Drenagem) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

LOPEZ, F. B.; CHAUHAN, Y.S.; JOHANSEN, C. Effects of timing of drought stress on leaf area development and canopy light interception of short-duration pigeonpea. **Journal of Agronomy and Crop Science**, California, v. 178, n. 1, p. 1-7, 2008.

LOURENÇO, M.V. Biotecnologia de plantas medicinais: Produção de biomoléculas. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 63-65, 2003.

LOW, P.S.; MÉRIDA, J.R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiologia Plantarum**, v.96, p.533-542, 1996.

MAHDAVIAN, K.; GHORBANLI, M.; KALANTARI, K. M. Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation induced oxidative stress in pepper leaves. **Russian Journal of plant Physiology**, New York, v. 55, n. 4, p. 560-563, 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas:** princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1997. 319p.

MASON, H.S.; DeWALD, D.B.; CREELMAN, R.A.; MULLEN, J.E. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 98, p. 859-867, 1992.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal:** Fotossíntese. Respiração. Relações Hídricas. Nutrição Mineral. 3. ed. Viçosa: Editora da UFV, 2005. 451 p.

MARDANI, H. et al. Assessment of Salicylic Acid Impacts on Seedling Characteristic of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) under Water Stress. **Notulae Scientia Biologicae**, v.4, n. 1, p. 112-115, 2012.

MARIN, A. **Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.).** 2003. 87 p. Dissertação



(Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

MARTÍN, F. J. P. **Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino**. 2009. 395 f. Tese (Doutorado em Ciencias Biológicas) – Faculdade de Ciencias, Universidade de Granada, Granada, 2009.

MCCORMICK, A. J. **Sink Regulation of Photosynthesis in Sugarcane**. 2007. 254 f. PhD Thesis (Doctorate of Philosophy) – University of KwaZulu-Natal, Durban, 2007.

MELLO, R. de. **Caracterização dos componentes extracelulares produzidos em cultura de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MENEGHETTI, R. C. **Avaliação do fosfito de potássio sobre o progresso de *Phakopsora pachyrhizi* em soja**. 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of Plant Nutrition**. 5. ed. (completely revised). Dordrecht : Kluwer, 2001. 849 p.

MERCHANT, A. et al. Contrasting physiological response of six *Eucalyptus* species to water deficit. **Annals of Botany**, London, v.100, n.7, p.1507- 1515, 2007.

MÉTRAUX, J. P. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, Oxford , v. 7, p. 332-334, 2002.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MOLLER, I.M., JENSEN, P.E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MORAES, J. V. **Parâmetros biométricos, fisiológicos e bioquímicos em híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptu surophylla* sob diferentes regimes de irrigação em casa de vegetação**. 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MYSORE, K. S. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, p. 730-715, 2008.

NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n. 12, p. 1963-1969, 1998.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; et al. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Viçosa, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; ALBUQUERQUE, M. B.; SILVA, E. C. da. Aspectos ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. In: NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. p. 22-31.

NOJOSA, G. B. de A.; RESENDE, M. L. V.; RESENDE, A. V. **Uso de fosfitos e silicatos na indução de resistência**. In: CAVALCANTI, L. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

NOREEN, S. et al. Exogenous application of salicylic acid enhances antioxidative capacity in salt stressed sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 4, n. 1, p. 473-479, 2009.

NUNES, C. M. J. **Caracterização da resposta ao déficit hídrico de linhas transgênicas de *Medicago trunculata* cv. Jemalong**. 2007. 64p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

PAIVA, A. S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 161-169, 2005.

PALMA, F. et al. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 58, p. 307-316, 2009.

PANCHEVA, T. V.; POPOVA, L. V.; UZUNOVA, A. N. Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, p. 57-63, 1996.

PARK, S. W. et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Sciense**, v. 318, p. 113-116, 2007.

PAVAN, B. E. **Crescimento de clones de eucalipto submetidos a diferentes regimes hídricos em casa-de-vegetação**. 2003. 43 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PEREIRA, M. R. R. **Comportamento fisiológico e morfológico de clones de *Eucalyptus* sp. w. (hill ex. maiden) submetidos a diferentes níveis de água no solo**. 2006. 69p. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.

PESSARAKLI, M. **Handbook of Plant and Crop Physiology**. 2<sup>nd</sup> edition revised and expanded. New York : Marcel Dekker, Inc, 2001. 997 p.

PEEVA, V., CORNIC, G. Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, n. 2-3, 2009.

POLIZEL, A. M. **Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A: DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

PRADOS, L. M. Z. **Respostas ao déficit hídrico em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e caupi (*Vigna unguiculata*), induzidas por óxido nítrico**. 50 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

QUEIROZ, C. G. S.; GARCIA, Q. S.; LEMOS FILHO, J. P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 14, p. 59-63, 2002.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M.N.V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidante enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v.138, p.157-165, 1998.

ROMERO, R. R. **Resposta fisiológica de plantas de *Eucalyptus grandis* à adubação com potássio ou sódio**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiologia e

Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SANCHEZ, F. Jasmonatos: compuestos de alto valor para la agricultura: Actividad biológica y ruta biosintética del ácido jasmónico en plantas. **Revista ICIDCA**, La Habana, v. 42, n. 1-3, p. 51-59, 2008.

SANT’ ANNA, H. L. S. **Aspectos fisiológicos de variedades de citros submetidas à deficiência hídrica progressiva**. 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2009.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Florestal**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. **Embrapa: Circular Técnica**, Colombo, 2001.

SAUSEN, T. L. **Respostas fisiológicas de *Ricinus communis* à redução de disponibilidade de água no solo**. 87 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia – Agrometeorologia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SASSE, J.; SANDS, R.; WHITEHEAD, D.; KELLIHER, F. M. Comparative responses of cuttings and seedlings of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus* to water stress. **Tree Physiology**, Oxford, v. 16, p. 287-294, 1996.

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; D'ARTAGNAN, L. de A. Estresse de água no crescimento, produtividade e acúmulo de prolina em feijão. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 15, p. 157-166, 1981.

SAWAZAKI, H. E.; TEIXEIRA, J. P. F.; BULISANI, E. A. Temperatura, umidade relativa e disponibilidade de água no acúmulo de prolina em cultivares de feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 44, p. 569-577, 1985.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 333-341, 2002.

- SHAKIROVA, F. M. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 3, p. 317-322, 2003.
- SHULAEV, V. et al. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, London, v. 318, p. 718-721, 1997.
- SHULAEV, V. et al. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 199-208, 2008.
- SHVALEVA, A. L. et al. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2005.
- SILVA, J. C. Influência dos tratamentos silviculturais na qualidade da madeira. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 75, p. 1-10, 2003.
- SILVA, E. A.; et al. Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis of Arábica coffee trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 349-357, 2004.
- SILVA, M. R.; KLAR A. E.; PASSOS J. R. Efeitos do manejo hídrico e da aplicação de potássio nas características morfofisiológicas de mudas de *Eucalyptus grandis* (Hill ex. Maiden). **Irriga**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 31-40, 2004a.
- SILVA, W. da et al. Índice de consumo e eficiência do uso da água em Eucalipto submetido a diferentes teores de água em convivência com a braquiária. **Floresta**, Curitiba, v. 34, n. 3, p. 325-335, 2004b.
- SILVA, J. C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. **Revista da Madeira**, n. 92, p. 61-66, 2005.
- SILVA, M. A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2007.
- SILVEIRA, R. L. V. A.; MALAVOLTA, E. Nutrição e adubação potássica em *Eucalyptus*. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 91, 2000.

SINGH, T. N. et al. Changes in proline concentration in excised plant tissues. **Australian Journal of Biological Science**, v. 26, p 57-63, 1973.

SINGH, S. P. Effect of non-auxinic chemicals on root formation in some ornamental plant cuttings. **Advanced Horticulture Forestry**, v. 3, p. 207-210, 1993.

SINGH, B.; USHA, K. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht , v. 39, n. 2, p. 137-141, 2003.

SOUZA, R. P. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, n. 51, p. 45-56, 2004.

STAPE, J. L. A pesquisa silvicultural e a visão socioambiental são imprescindíveis para os novos clusters florestais. **Revista Opiniões**, Ribeirão Preto, p. 37, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAJI, T. et al. Important roles of drought - and cold – inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant**, v. 29, p. 417-426, 2002.

TATAGIBA, S. D. et al. Comportamento fisiológico de dois clones de *Eucalyptus* na época seca e chuvosa. **Cerne**, Lavras, v.13, n.2, p.149-159, 2007.

TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M. Cinética de emissão de fluorescência das clorofilas em dois clones de *Eucalyptus*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 5, n. 10, 2007. Disponível em:  
<[http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO\\_06.pdf](http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO_06.pdf)> Acesso em: 08 out. 2012.

TAYLOR, C. B. Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

TEIXEIRA, P. C.; LEAL, P. G. L.; BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F. Nutrición potásica y relaciones en plantas de *Eucalyptus* spp. **Bosque**, Valdivia, v. 16, n.2, p. 61-68, 1995.

TORMENA, C. A. et al. Intervalo ótimo de potencial de água no solo: um conceito para avaliação da qualidade física do solo e manejo da água na agricultura irrigada. **Revista**

**Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 3, p. 286-292, 1999.

TULLY, R. E. et al. Proline Accumulation in Water-stressed Barley Leaves in Relation to Translocation and the Nitrogen Budget. **Plant Physiology**, Washington, 63, p. 518-523, 1979.

VANACKER, H. et al. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 209-216, 2001.

VELINI, E. D. et al. **Glyphosate**. 1 ed. Botucatu: FEPAF, 2009. 496 p.

VERPOORTER, R; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, Viena, v. 35, n. 5, p. 735-759, 2008.

VIANA, M. B. O eucalipto e os efeitos ambientais do seu plantio em escala. **Câmara dos Deputados - Consultoria Legislativa**, Brasília, 2004, 29 p. Disponível em: <[http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1162/eucalipto\\_efeitos\\_boratto.pdf](http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1162/eucalipto_efeitos_boratto.pdf)>. Acesso em: 24 jan. 2013.

VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 75, p.458- 461, 1984.

VIEIRA, J. G. **Aplicação exógena de ácido salicílico em feijoeiro**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção vegetal) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2011.

WASTERNACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 72, p.165-221, 2002.

WILDERMUTH, M.C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, London, v. 414, p. 562-565, 2001.

XU, Q.; XU, X.; ZHAO, Y.; JIAO, K.; HERBERT, S. J.; HAO, L. Salicylic acid-altering *Arabidopsis* mutants response to NO<sub>2</sub> exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 84, p. 106-111, 2009.

YASUDA, M. et al. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1678-1692, 2008.

YILDIRIM, E.; TURAN, M.; GUVENC, I. Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll, and mineral content of cucumber grown under salt stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 31, p. 593-612, 2008.

YOUNG, A. L.; FRANK, H. A. Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. **J. Photoch. Photobiol. B: Biol.**, v.36, p.3-15, 1996.

YUAN, S.; LIN, H. H. Role of salicylic acid in plant abiotic stress. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C. A Journal of Biosciences**, v. 63, p. 313-320, 2008.

ZHANG, W.; CURTIN, C.; KIKUCHI, M.; FRANCO, C. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. **Plant Science**, Limerick, v.162, p.459-468, 2002.

ZIMILA, H. E. **Síntese de reguladores de crescimento de plantas derivados de naftaleno**. 2011. 80 p. Trabalho de Licenciatura – Faculdade de Ciências, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, 2011.

ZUCARELI, V. **Aspectos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos da enxertia de maracujazeiros sobre *Passiflora cincinnata* Mast.** 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2011.