

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DO ETIL-TRINEXAPAC NO METABOLISMO PRIMÁRIO DO EUCALIPTO
EM CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Allan Lopes Bacha

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Laboratório de Plantas Daninhas

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária

FCAV / UNESP – Jaboticabal

Jaboticabal – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DO ETIL-TRINEXAPAC NO METABOLISMO PRIMÁRIO DO EUCALIPTO
EM CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Discente: Allan Lopes Bacha

Orientador: Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Agronomia
(Produção Vegetal)**

2022

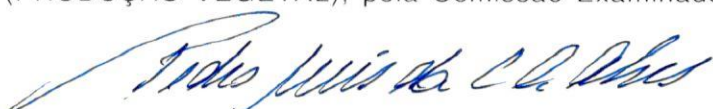
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DO ETIL-TRINEXAPAC NO METABOLISMO PRIMÁRIO DO EUCALIPTO EM CONDIÇÕES DE DEFICIÊNCIA HÍDRICA

AUTOR: ALLAN LOPES BACHA

ORIENTADOR: PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP



Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV UNESP Jaboticabal



Profa. Dra. JUANA TERESA VILLALBA FARINHA (Participação Virtual)
Universidad de la Republica / Montevideu/Uruguay



Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES (Participação Virtual)
Ciências Florestais / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz



Jaboticabal, 30 de novembro de 2021

B118e Bacha, Allan Lopes
 Efeito do etil-trinexapac no metabolismo primário do
eucalipto em condições de deficiência hídrica / Allan Lopes
Bacha. -- Jaboticabal, 2021
 96 p.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Pedro Luis da Costa Aguiar Alves

 1. Regulador de crescimento vegetal. 2. Hormesis. 3.
Fisiologia do eucalipto. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Allan Lopes Bacha – Nasceu em 21 de novembro de 1987, na cidade de Ribeirão Preto-SP, filho de Antonio Jorge Bacha e Rose Mary de Oliveira Lopes Bacha. Em fevereiro de 2009 ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, câmpus de Jaboticabal, tendo concluído o curso de Licenciatura em fevereiro de 2013 e Bacharelado em agosto de 2015. De 2010 à 2015 atuou como professor bolsista no projeto Cursinho Ativo da mesma Universidade. Em 2013 iniciou estágio no Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), onde realizou diversos trabalhos na área de fisiologia vegetal e matologia, e também seu Trabalho de Conclusão de Curso. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia, pelo Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP - Jaboticabal, tendo concluído o curso em julho de 2017. Em fevereiro de 2018 ingressou no curso de Doutorado em Agronomia, pelo Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP - Jaboticabal, tendo concluído o curso em dezembro de 2021. Foi bolsista FAPESP, tendo sua BEPE aprovada para condução de Doutorado sanduíche na Universidad Politécnica de Valência - UPV no ano de 2020. No entanto, devido à Pandemia COVID-19, não foi possível sua realização. Durante esses anos no LAPDA, atuou como coorientador de diversos ICs/TCCs, organizou Eventos Internacionais, atuou como Editor de Anais de Eventos, teve um livro publicado além da autoria e coautoria de diversos artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais. Mais detalhes sobre o CV do autor se encontram no Sistema Lattes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Antonio Jorge Bacha e Rose Mary de Oliveira Lopes Bacha, pelo amor, educação, dedicação, apoio e conselhos que sempre me deram. Ao meu irmão, Renan Lopes Bacha, pela amizade, ajuda, carinho e sei que sempre poderei contar com ele; e a toda minha família, pois eles fazem parte do que sou.

Ao grande Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, por ser essa pessoa tão especial! E também por ter me acolhido em seu laboratório no início de minha caminhada acadêmica e por ter me proporcionado diversas oportunidades para meu desenvolvimento pessoal e profissional; por ter depositado sua confiança em mim, pela paciência, amizade, carinho, atenção, orientação e conselhos que sempre me deu e continua dando.

Aos amigos do LAPDA, pela amizade de sempre, suporte, ensinamentos e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável. Saibam que vocês também fizeram a diferença na minha caminhada!

Aos integrantes da banca de qualificação, Prof. Dr. Rinaldo César de Paula e Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto, pelas sugestões apontadas no trabalho.

Aos integrantes da banca de defesa, Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, Prof^a. Dr^a. Juana Villalba, Prof. Dr. Rogério Falleiros Carvalho e Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves pelas diversas sugestões e apontamentos que foram e serão válidos para esse e outros trabalhos futuros.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto (Processo Nº 2018/04376-9).

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, pelo auxílio sempre que necessário.

E claro, ao amor da minha vida, Fernanda Merelles Bacha, minha amada esposa! Sou muito grato ao Universo pelo nosso reencontro! Te amo!

Um grande abraço a todos vocês, e meu MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. A cultura do eucalipto no Brasil	14
2.2. Deficiência hídrica no eucalipto.....	15
2.3. Efeito hormético ou <i>hormesis</i>	16
2.4. Sobre o etil-trinexapac	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Experimento 1 – Curva dose-resposta.....	21
3.2. Experimento 2 – Resposta do eucalipto a três doses de etil-trinexapac	24
3.3. Análise de compostos do metabolismo primário	28
4. RESULTADOS	31
4.1. Experimento 1 – Curva dose-resposta.....	31
4.2. Experimento 2 - Resposta do eucalipto a três doses de etil-trinexapac.....	45
4.3. Análise de compostos do metabolismo primário	74
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

Efeito do etil-trinexapac no metabolismo primário do eucalipto em condições de deficiência hídrica

RESUMO – Plantas de eucalipto são sensíveis às interferências impostas por fatores estressantes durante seu crescimento inicial, sendo a deficiência hídrica o mais comum dentre eles. Estudos anteriores relataram que o etil-trinexapac pode ocasionar efeito positivo ao crescimento de mudas de eucalipto, mas não existem trabalhos que provaram a ocorrência de hormese para este composto. A hormese é um efeito estimulatório ocasionado pela aplicação de baixas doses de um produto químico que seria tóxico em elevadas quantidades. Com isso, o objetivo foi verificar o possível efeito hormético do etil-trinexapac em mudas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), em condições normais e com deficiência hídrica, e seus efeitos no metabolismo primário do eucalipto. Para isso, dois experimentos foram conduzidos em condições semicontroladas, em vasos de 25 L e 15 L, durante 90 e 81 dias após o plantio (DAP) do eucalipto, respectivamente para os experimentos 1 e 2. O primeiro experimento consistiu da aplicação de oito doses de etil-trinexapac, a saber: 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹, e duas condições hídricas (condição normal e sob deficiência hídrica, mantidas em 40% da capacidade de campo), em oito repetições. A aplicação do produto ocorreu um dia antes do plantio do eucalipto. Foram realizadas avaliações de trocas gasosas, eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) e teor relativo de clorofila total dos 9 aos 15 DAP. Quinzenalmente, foram feitas avaliações de altura e diâmetro do eucalipto. Ao final do período experimental (90 DAP), foi determinada a área foliar do eucalipto, seguido das massas secas de folhas e caules. O segundo experimento foi conduzido em seis repetições, nos mesmos locais e condições do primeiro experimento, com as doses estabelecidas pelos resultados encontrados; foram elas: 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹. Foram realizadas avaliações destrutivas (juntamente com a coleta dos materiais para as análises de metabolismo primário) aos 8, 14, 21, 42 e 81 DAP. As avaliações destrutivas consistiram da mensuração da altura, diâmetro, área foliar e massas secas de folhas e caules. Dos 02 aos 06 DAP, foram realizadas avaliações de trocas gasosas, F_v/F_m e do teor relativo de clorofila total nos horários: 9:00; 11:00; 13:00; 15:00; e 17:00. Em ambos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância pelo

teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, bem como submetidos à análise de regressão. Para a análise de compostos do metabolismo primário, os materiais vegetais foram preparados em extratos para isolamento e confecção do perfil dos metabolitos, e as frações coletadas foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Os dados coletados foram submetidos à análise de componentes principais. O etil-trinexapac ocasionou efeito estimulatório nas mudas de eucalipto, sendo a dose de 150 g i.a. ha^{-1} aquela que proporcionou maior crescimento às plantas. Apesar disso, este produto não proporcionou a *hormesis* completa no eucalipto (i.e., o efeito bifásico, sendo estimulatório em baixas doses, seguido de efeito deletério em altas doses), não sendo tóxico às plantas até a dose de 300 g i.a. ha^{-1} . A restrição hídrica foi condição limitante ao crescimento do eucalipto, assim, as plantas nessas condições não sofreram efeito estimulatório do etil-trinexapac. O etil-trinexapac ocasionou alterações no metabolismo primário das plantas de eucalipto cultivadas sem restrição hídrica, possivelmente resultando em uma maior produção de carboidratos. No entanto, mais pesquisas que objetivem estudar os efeitos deste regulador de crescimento vegetal na cultura do eucalipto devem ser realizadas, principalmente trabalhos que avaliem as alterações hormonais nas plantas.

Palavras-chave: *Eucalyptus urograndis*, regulador de crescimento vegetal, *hormesis*, giberelina, estresse abiótico, fisiologia do eucalipto.

Trinexapac-ethyl effect on eucalyptus primary metabolism under drought stress conditions

ABSTRACT – Eucalyptus plants are sensitive to interference imposed by stress factors during their initial growth, with water deficit being the most common among them. Previous studies reported that trinexapac-ethyl can have a positive effect on the growth of eucalyptus seedlings, but there are no studies that have proven the occurrence of *hormesis* for this chemical compound. *Hormesis* is a stimulatory effect caused by the application of low doses of a chemical that would be toxic in high amounts. Thus, the objective of this study was to verify the possible hormetic effect of trinexapac-ethyl on *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) seedlings, under normal conditions and with water deficit, and its effects on the primary metabolism of eucalyptus plants. For this, two experiments were conducted under semi-controlled conditions, in 25 L and 15 L pots, for 90 and 81 days after planting (DAP) of eucalyptus, respectively for experiments 1 and 2. The first experiment consisted of the application of eight doses of trinexapac-ethyl, namely: 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 300 g a.i. ha⁻¹, and two water conditions (normal condition and under water deficit, maintained at 40% of field capacity) in eight repetitions. Trinexapac-ethyl was sprayed one day before eucalyptus planting. Evaluations of gas exchange, photosystem II quantum efficiency (F_v/F_m) and total relative chlorophyll content from 9 to 15 DAP were carried out. Every two weeks, eucalyptus height and stem diameter assessments were carried out. At the end of the experimental period (90 DAP), the eucalyptus leaf area was determined, followed by the dry mass of leaves and stems. The second experiment was carried out in six replications, in the same places and conditions as the first experiment, with the doses established by the results found; they were: 0, 90 and 150 g a.i. ha⁻¹. Destructive assessments were performed (along with the collection of materials for primary metabolism analyses) at 8, 14, 21, 42 and 81 DAP. Destructive evaluations consisted of measuring height, diameter, leaf area and dry mass of leaves and stems. From 02 to 06 DAP, evaluations of gas exchange, F_v/F_m and the total relative chlorophyll content were carried out at the following times: 9:00 am; 11:00 am; 1:00 pm; 3:00 pm; and 5:00 pm. In both experiments, the data were submitted to analysis of

variance by the F test and the means were compared by the Tukey test at the 5% probability level, as well as submitted to regression analysis. For the analysis of compounds from primary metabolism, plant materials were prepared in extracts for isolation and profiling of metabolites, and the collected fractions were analyzed by ^1H Nuclear Magnetic Resonance. The collected data were subjected to principal component analysis. Trinexapac-ethyl had a stimulatory effect on eucalyptus seedlings, and the dose of $150 \text{ g a.i. ha}^{-1}$ provided greater plant growth. Nevertheless, this product did not provide complete *hormesis* in eucalyptus (*i.e.*, the biphasic effect, being stimulatory at low doses, followed by deleterious effect at high doses), thus, not being toxic to plants at doses up to $300 \text{ g a.i. ha}^{-1}$. Water restriction was a limiting condition for eucalyptus growth, thus, plants under these conditions did not suffer a stimulatory effect of trinexapac-ethyl. Trinexapac-ethyl caused alterations in the primary metabolism of plants cultivated without water restriction, possibly resulting in a greater production of carbohydrates. However, more researches aiming to study the effects of this plant growth regulator in the eucalyptus crop must be carried out, mainly works that evaluate the hormonal alterations in the plants.

Keywords: *Eucalyptus urograndis*, plant growth regulator, *hormesis*, gibberellin, abiotic stress, eucalyptus physiology

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é a cultura mais importante do setor florestal brasileiro, o qual apresenta importante relevância na economia do País, com representação de 1,2% do PIB nacional e geração de 3,75 milhões de empregos diretos e indiretos (IBÁ, 2020).

Devido aos programas de melhoramento genético, bem como do desenvolvimento de estratégias de manejo mais eficientes (Stape et al., 2004), as florestas de eucalipto do Brasil se tornaram as mais produtivas do mundo, atingindo, em 2019, $35,3 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, em mais de 6,97 milhões de hectares plantados, tendo sua matéria prima destinada principalmente à produção de energia, papel, celulose e construção civil (IBÁ, 2020).

A fase de crescimento inicial do eucalipto (período que compreende o primeiro ano após o plantio da cultura no campo) é o momento em que as plantas estão mais suscetíveis a interferências impostas por fatores estressantes (Nambiar e Sands, 1993; Garau et al., 2008), sendo a deficiência hídrica a mais importante dentre eles, podendo ocasionar perdas de até 47% na matéria seca das folhas e 44% na matéria seca do caule (Correia et al., 2014).

Devido à expansão da eucaliptocultura pelas mais diversas regiões do Brasil (ABRAF, 2013), na qual muitas delas apresentam sistemas com baixa disponibilidade hídrica, são necessários estudos que busquem maneiras de auxiliarem as mudas de eucalipto a superarem os períodos estressantes. Assim, a aplicação de etil-trinexapac pode ser uma opção viável, uma vez que a pulverização deste produto proporciona ganhos de até 70% ao desenvolvimento inicial do eucalipto em condições normais (Pires et al., 2013, 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017).

Esse efeito positivo, resultante da aplicação de baixas doses de produtos químicos, faz parte do fenômeno hormético (ou *hormesis*). Por definição, *hormesis* é caracterizado como sendo um efeito estimulatório ocasionado pela aplicação de baixas doses de um produto químico que seria tóxico em altas quantidades (Calabrese e Baldwin, 2002). Este conceito foi introduzido por Southam e Ehrlich (1943) e já foi provada sua ocorrência para diversas espécies vegetais, incluindo arbóreas, como eucalipto, pinus e café, sendo o glyphosate o produto mais estudado

para esse fim (Duke et al., 2006; Carbonari et al., 2007; Cedergreen et al., 2007; Velini et al., 2008; Velini et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Pereira et al., 2013; Brito et al., 2017).

O etil-trinexapac é um regulador de crescimento vegetal, pertencente ao grupo químico das acilciclohexanedionas, frequentemente utilizado como maturador na cultura da cana-de-açúcar e redutor de crescimento em cereais de inverno, e que atua nas fases finais da biossíntese da giberelina (Rademacher, 2000; Hedden e Sponsel, 2015). Em nível molecular, o etil-trinexapac atua reduzindo a conversão de GA₂₀ para GA₁ (uma das principais giberelinas ativas), devido à competição entre o maturar e o 2-oxogluterato pelo cosubstrato Fe⁺²/ascorbato dependente dioxigenase, o que resulta na inibição da hidroxilação na posição 3 β da molécula (Adams et al., 1992; Hedden, 2016). No entanto, paradoxalmente, este produto também inibe a hidroxilação na posição 2 β , fazendo com que as giberelinas GA₁ já presentes na planta, não sejam convertidas em GA₈, uma conformação bioinativa da molécula (Griggs et al., 1991; Hisamatsu et al., 1998; Rademacher, 2016). Assim, é provável que esta seja a causa do aumento do crescimento do eucalipto observado em trabalhos anteriores (Pires et al., 2013, 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017). No entanto, mais trabalhos devem ser realizados de maneira a confirmar tal hipótese. Além disso, aventa-se a possibilidade de que esta resposta ocasione um desbalanço hormonal na planta, provocando um efeito sinérgico entre os hormônios, ocasionando o efeito positivo anteriormente relatado.

Com isso, à luz de resultados positivos anteriormente obtidos em condições sem estresse, pelo nosso grupo de pesquisa, estudos que busquem investigar o efeito da aplicação de etil-trinexapac em mudas de eucalipto sob condições de deficiência hídrica podem fornecer informações importantes para o aprimoramento dos cultivos em regiões com baixa disponibilidade hídrica no solo, proporcionando, assim, aumentos de produtividade, além da viabilidade da implantação de eucaliptais.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o possível efeito hormético bifásico de etil-trinexapac em mudas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), em condições normais e de deficiência hídrica. Também foi estabelecida a dose que proporciona o maior efeito positivo às mudas de eucalipto nas condições de cultivo

anteriormente citadas, bem como delimitar a maior dose na qual o etil-trinexapac não proporciona efeito deletério à cultura (que proporciona crescimento semelhante à testemunha). Além disso, também foi investigado, através de técnicas de metabolômica, os efeitos das doses no metabolismo primário do eucalipto nas condições propostas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do eucalipto no Brasil

O gênero *Eucalyptus* é pertencente à família Myrtaceae, no qual estão inclusas mais de 1.200 espécies (THE PLANT LIST, 2017). A maior parte delas tem sua origem na Austrália, mas algumas são procedentes de outros países ao norte dessa região, como Indonésia, Papua-Nova Guiné e Filipinas (Eldridge et al., 1994).

O setor florestal destaca-se no agronegócio brasileiro e gera, no país, cerca de 3,75 milhões de empregos diretos e indiretos, com representação de 1,2% do PIB nacional (IBÁ, 2020). Com a maior produtividade de eucalipto do mundo ($35,3 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), o Brasil apresentou, em 2019, uma área plantada de 6,97 milhões de hectares, sendo a região sudeste responsável por 48% do total da produção da cultura (IBÁ, 2020).

As espécies de eucalipto plantadas no Brasil apresentam diversas finalidades, como produção de carvão vegetal, papel e celulose, construção civil, óleos essenciais, sendo também utilizadas nas indústrias química e farmacêutica. Segundo González (2002), o que possibilita os mais diversos usos dos produtos das florestas plantas são a alta produtividade e adaptabilidade das espécies utilizadas, bem como de suas características físico-mecânicas. Com isso, cada vez mais o setor florestal vem ocupando lugar de destaque frente a outros seguimentos industriais.

As principais espécies utilizadas em plantios de eucalipto no Brasil são: *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna* e *E. urograndis*. Dentre essas, *E. urograndis* tem se destacado em plantações comerciais, devido à grande capacidade de rebrota, ótimo vigor e resistência ao cancro (Moura, 2004; Rocha et al., 2006). Com isso, diversos clones ganharam visibilidade no setor, pois

apresentam alta qualidade nas características da madeira e homogeneidade nos plantios clonais em larga escala (Correia et al., 1995).

No entanto, deve-se ressaltar que os primeiros meses após o plantio das mudas no campo, período que compreende a fase de crescimento inicial do eucalipto, é o momento em que as plantações se encontram mais suscetíveis às interferências impostas por fatores estressantes, tanto bióticos quanto abióticos (como a deficiência hídrica), podendo resultar em decréscimo de até 73% na área foliar e 50% na matéria seca total (Shvaleva et al., 2006). Assim, estudos que busquem maneiras de proporcionar ganhos ao eucalipto na fase de crescimento inicial (com a aplicação de etil-trinexapac, por exemplo), podem fornecer informações importantes de maneira a reduzir o efeito negativo de tais fatores estressantes na produtividade.

2.2. Deficiência hídrica no eucalipto

Tanto fatores bióticos (competição, herbivoria) quanto abióticos (tais como pH do solo, disponibilidade de água, nutrientes e luminosidade), podem afetar diretamente o crescimento das culturas florestais e seus subprodutos (Pitelli e Marchi, 1991).

Dentre os fatores ambientais que podem limitar a produção dos sistemas agrícolas e florestais, a água figura-se como o mais importante entre eles, uma vez que afeta diretamente o metabolismo da planta, causando grandes perdas de produtividade (Flexas et al., 2002). Ainda, é importante ressaltar que, conforme observado por diversos autores, os sintomas ocasionados pela deficiência hídrica são mais drásticos na fase de crescimento inicial do eucalipto (Silva et al., 2004; Susiluoto e Berninger, 2007; Correia et al., 2014).

Tal interferência se dá pelo fato de as moléculas de água agirem como doadores de elétrons para o processo fotossintético e, como consequência, possuem influência direta na produção de ATP, uma vez que os prótons H^+ liberados no interior do tilacóide são utilizados pela bomba ATP-sintase. Além disso, afetam diretamente a atividade da Rubisco e da regeneração da RuBP (Lawlor, 2002; Parry et al., 2002).

Em estudo com diferentes clones de eucalipto sob deficiência hídrica, Vellini et al. (2008) observaram que os clones apresentaram reduções nas características avaliadas na medida em que houve diminuição na frequência da irrigação, as quais foram realizadas diariamente (controle), a cada dois, quatro ou seis dias. Na mesma linha de pesquisa, Gonçalves e Passos (2000) relataram que todos os parâmetros de crescimento de cinco clones de eucalipto reduziram de acordo com o aumento das deficiências hídrica e nutricional do solo, sendo o *E. urophylla* o menos afetado pela condição estressante, apresentando os maiores valores para diâmetro do caule, enquanto *E. cloeziana* foi a espécie que apresentou maiores reduções em altura, diâmetro e massa seca total.

Outras respostas fisiológicas característica de baixa disponibilidade de água no solo e que também apresentam influência direta na fotossíntese são o fechamento estomático e a redução da taxa de assimilação líquida de CO₂. O fechamento dos estômatos tem por finalidade evitar a perda de água por transpiração, e é resultado de uma complexa rede de sinalização, cujo hormônio ácido abscísico (ABA) apresenta função primordial nesse processo (Zhang et al., 2006; Jiang e Hartung, 2008), sendo reportado em estudos anteriores com plantas de eucalipto em condições de deficiência hídrica (Granda et al., 2011; Correia et al., 2014, 2018). Em relação à taxa de fixação de carbono, diversos autores ressaltam que a redução desta característica não está somente relacionada ao fechamento estomático, mas também na redução da condutância do CO₂ no mesófilo foliar, na qual as aquaporinas parecem estar envolvidas, principalmente em condições de déficit hídrico (Hanba et al., 2004; Flexas et al., 2006; Flexas et al., 2008; Miyazawa et al., 2008).

Além destes, outros processos fisiológicos também são afetados pela baixa disponibilidade hídrica, pois as propriedades das moléculas de água influenciam diretamente outros constituintes celulares, como os ácidos nucleicos, as estruturas das proteínas e as membranas das células (Taiz e Zeiger, 2013).

2.3. Efeito hormético ou *hormesis*

Alguns produtos químicos, que possuem características similares a hormônios vegetais, vêm ganhando destaque no cultivo de diversas culturas, especialmente

naquelas de alto valor econômico, como é o caso do eucalipto. Esses produtos atuam alterando os processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos nas estruturas celulares das plantas, podendo ocasionar promoção ou inibição das características avaliadas. Tais produtos químicos, que foram, em sua maioria, introduzidos no mercado como herbicidas ou maturadores, quando aplicados em subdoses, podem auxiliar no crescimento e desenvolvimento das plantas.

Esse efeito positivo, resultante da aplicação de baixas doses de produtos químicos, faz parte do fenômeno hormético (ou *hormesis*). Por definição, *hormesis* é caracterizado como sendo um efeito estimulatório ocasionado pela aplicação de baixas doses de um produto químico que seria tóxico em altas quantidades (Calabrese e Baldwin, 2002). Este conceito foi introduzido por Southam e Ehrlich (1943) e já foi provada sua ocorrência para diversas espécies vegetais, incluindo arbóreas, como eucalipto, pinus e café, sendo o glyphosate o produto mais estudado para esse fim (Duke et al., 2006; Carbonari et al., 2007; Cedergreen et al., 2007; Velini et al., 2008; Velini et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Pereira et al., 2013; Brito et al., 2017).

Pereira et al. (2013) observaram que a aplicação de 18 g e.a. ha⁻¹ de glyphosate ocasionou acréscimo de 34% na área foliar e 22% na matéria seca do caule de mudas de *E. urograndis* aos 42 dias após a aplicação. Na mesma linha, Carbonari et al. (2007) observaram que a aplicação de baixas doses de glyphosate (entre 3,6 e 7,2 g e.a ha⁻¹) ocasionou estímulo no crescimento do eucalipto, aumentando a biomassa e área foliar das plantas. Já no trabalho de Velini et al. (2008), foram observados aumentos de até 70% na matéria seca total de *E. grandis*, em resposta à aplicação de doses menores que 10 g e.a. ha⁻¹, aos 60 dias após a aplicação do glyphosate. Uma das possíveis causas do aumento do crescimento observado nos trabalhos anteriores está relacionada ao sítio de ação molecular do glyphosate, uma vez que o efeito não foi observado em plantas resistentes, e também devido ao fato de que os níveis de shikimato aumentaram em plantas que obtiveram o efeito positivo no crescimento (Velini et al., 2008).

Em relação ao etil-trinexapac, diversos estudos provaram o efeito estimulatório deste regulador de crescimento vegetal no eucalipto (Pires et al., 2013, 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017, 2018). No entanto, ainda não

existem trabalhos na literatura que comprovem a resposta hormética (no qual há um efeito positivo de baixas doses, seguido do efeito negativo de doses elevadas, i.e., uma resposta bifásica) proveniente da aplicação de etil-trinexapac, sendo este um campo a ser estudado.

Aplicando 20 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac em mudas de *E. urograndis*, Pires et al. (2013) encontraram aumentos de 20% em área foliar e 15% na massa seca das folhas, aos 42 dias após a aplicação do produto. Já Bacha et al. (2017), trabalhando com doses de 30 e 60 g i.a. ha⁻¹, observaram acréscimos de 70% nas massas secas das folhas e total, aos 90 dias após a aplicação do produto em mudas de *E. urograndis* (clone 1407). Os autores ainda observaram que o produto tardou 60 dias até a resposta positiva ser observada na altura e no diâmetro do caule do eucalipto, resposta esta que deve estar relacionada a um desbalanço hormonal que o produto causou na planta, sendo possível, inclusive, a ocorrência de um efeito sinérgico entre diferentes hormônios. Vale ressaltar, ainda, que em ambos os trabalhos anteriormente citados, os autores fizeram a aplicação nas mudas antes do plantio.

De outra maneira, Correia e Villela (2015) aplicaram 200 g i.a. ha⁻¹ aos 46 dias após o plantio das mudas de eucalipto no campo e observaram aumento de até 29% no diâmetro da copa, o que indica que a ocorrência do efeito positivo também está relacionada com a dose aplicada, bem como com o estágio de desenvolvimento das plantas, no qual plantas mais velhas necessitam de maiores doses do mesmo produto, em comparação às plantas mais jovens.

Este fenômeno pode ser observado no trabalho de Velini et al. (2008). Em estudo com *Commelina benghalensis*, os autores observaram que plantas com duas folhas expandidas obtiveram máxima resposta hormética (crescimento 98% maior que o da testemunha) com uma dose cinco vezes menor que a usada em plantas com quatro folhas expandidas.

Ainda, Belz e Duke (2014) ressaltam que a ocorrência, ou não, do efeito hormético está relacionada a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos ao desenvolvimento da planta, como por exemplo: condições ambientais no momento e após a aplicação do produto químico (Belz e Cedergreen, 2010); clone ou cultivar testado (McDonald et al., 2001; Bacha et al., 2017); estágio de desenvolvimento da planta (Carvalho et al., 2013); e o ponto final de avaliação (Cedergreen et al., 2009),

ou seja, o período entre a aplicação e a verificação do fenômeno hormético. Por isso, a informação de que o etil-trinexapac tarda cerca de 60 dias para expressar o efeito positivo no eucalipto, o qual pode ser observado no trabalho de Bacha et al. (2017), é uma importante informação para estudos futuros que busquem desvendar as causas do efeito estimulatório ocasionado pela aplicação do etil-trinexapac. Com isso, busca-se a possibilidade de aplicar tais conhecimentos no campo, de maneira a aumentar a produtividade das plantações de eucalipto em um futuro próximo.

2.4. Sobre o etil-trinexapac

O etil-trinexapac, o qual é conhecido comercialmente como Moddus[®], é um regulador de crescimento vegetal, classificado como moderadamente tóxico (classe toxicológica III). O Moddus[®] se apresenta na formulação de concentrado emulsionável e é composto por 75% de ingredientes inertes e adjuvantes, e 25% do princípio ativo etil-trinexapac. Comercialmente, este produto é recomendado para diversas culturas monocotiledôneas. Na cana-de-açúcar, a aplicação de etil-trinexapac tem como objetivo acelerar os processos de maturação das plantas. Uma vez que este produto atua inibindo a elongação dos entrenós, ele é também utilizado como redutor de crescimento em culturas de inverno, evitando o acamamento recorrente nessas culturas (Caldas et al., 2009; Nascimento et al., 2009; Rademacher, 2015; Moddus, 2021).

O produto etil-trinexapac é uma acilciclohexanediona que mimetiza a estrutura química do ácido 2-oxogluterato (Figura 1). A principal atividade deste produto químico se dá pela redução dos níveis de giberelinas ativas na planta (principalmente GA₁), uma vez que ele interfere nas fases finais da biossíntese deste hormônio (Adams et al., 1992; Rademacher, 2000; Hedden e Sponsel, 2015).

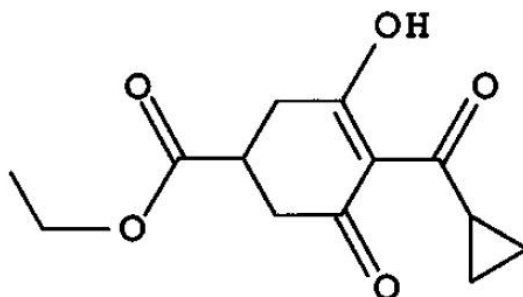


Figura 1. Estrutura química da molécula etil-trinexapac. Retirado de Rademacher (2000).

Em um primeiro momento, o etil-trinexapac atua inibindo a enzima GA₂₀ 3 β -hydroxylase, bloqueando a conversão de GA₂₀ (giberelina inativa) em GA₁ (geberelina biologicamente ativa) (Figura 2). Isso ocorre devido à competição entre o maturador e o 2-oxogluterato pelo cossustrato Fe⁺²/ascorbato-dependente dioxigenase (Adams et al., 1992; Hedden, 2016).

Rademacher (2016) aponta que, em alguns casos, pode haver um efeito paradoxal do etil-trinexapac nas plantas, uma vez que é esperado um efeito deletério do produto devido à inativação da conversão de GA₂₀ em GA₁. No entanto, foi provado que, além de prevenir a hidroxilação na posição 3 β , para a formação de GA₁ (Adams et al., 1992), o etil-trinexapac também inibe a hidroxilação na posição 2 β (Griggs et al., 1991). Isso evita que as giberelinas GA₁ já presentes na planta sejam transformadas em GA₈ (Hisamatsu et al., 1998), outra forma inativa deste composto. Com isso, é possível que a maior permanência das giberelinas ativas (GA₁) já existentes na planta, seja uma das causas dos efeitos positivos observados em estudos anteriores (Pires et al., 2013, 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017, 2018). Apesar desta hipótese, nenhum estudo comprovou as causas de tais efeitos benéficos no eucalipto.

Além disso, outra provável justificativa se encontra no fato de que a não conversão de GA₂₀ em GA₁ ocasione um maior acúmulo de GA₂₀ na planta (Figura 2), o que também pode ocasionar uma superatividade de GA₁ após a degradação do produto. Ainda, aventase a possibilidade de tal desbalanço hormonal ocasionar um efeito sinérgico entre outros hormônios, resultando nos efeitos positivos observados em trabalhos anteriores (Pires et al., 2013, 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017, 2018). Assim, estudos que busquem quantificar hormônios durante os dias após a aplicação do etil-trinexapac podem proporcionar informações importantes que visem à compreensão deste fenômeno e, como consequência, o entendimento deste processo pode levar a aumentos de produtividade em um futuro próximo.

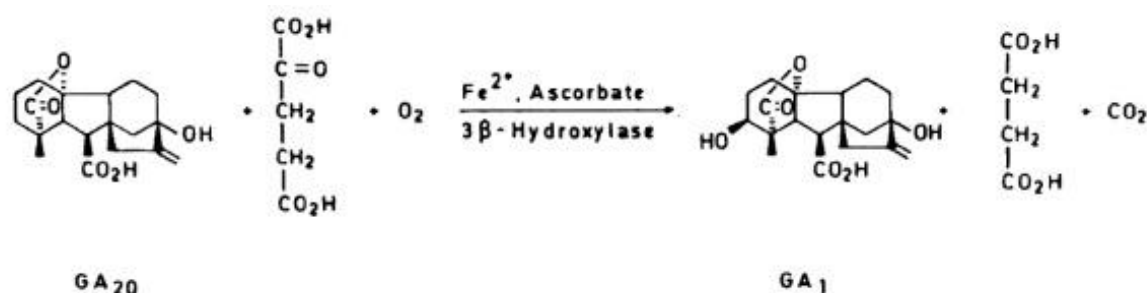


Figura 2. Conversão de GA₂₀ em GA₁ por meio da enzima 3β-hidroxilase (ADAMS et al., 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento 1 – Curva dose-resposta

O experimento foi instalado em condições semicontroladas (casa de vegetação), do Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), UNESP Jaboticabal/SP, Brasil. O clima da região, segundo classificação Köppen (1948), é do tipo Cwa, subtropical, seco no inverno, com chuvas de verão (dados meteorológicos do período experimental na Tabela 1). A altitude do local é de 590 m e as coordenadas geográficas são: latitude 21°15'17"S e longitude 48°19'20"W.

Tabela 1. Dados meteorológicos durante o período experimental. Jaboticabal-SP, 2019.

Mês (2019)	Pressão (hPa)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	UR (%)	Insolação (h)
Março	944,0	31,0	20,1	24,5	76,6	213,2
Abril	943,9	30,6	19,0	23,9	73,4	228,2
Maio	945,1	29,1	16,4	21,9	73,6	227,2
Junho	948,6	27,9	13,9	20,3	65,5	255,1
Julho	947,7	27,7	12,2	18,9	59,6	251,8

Pressão: pressão atmosférica; Tmax: temperatura máxima; Tmin: temperatura mínima; Tmed: temperatura média; UR: umidade relativa do ar.

O experimento foi conduzido durante 90 dias após o plantio (DAP) do eucalipto em vasos de 25 litros. Foi utilizada como substrato uma mistura de Latossolo Vermelho Escuro e areia na proporção de 2:1 (v/v), o qual foi submetido às análises química e física de rotina, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Análise química do substrato utilizado nas parcelas experimentais. Jaboticabal-SP, 2019.

pH CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	P resina mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	H+Al mmol _c dm ⁻³	SB	CTC	V %
5,9	9	9	1,3	22	5	16	28,3	44	64

Tabela 3. Análise física do substrato utilizado nas parcelas experimentais. Jaboticabal-SP, 2019.

Cabo da Roca, 2010:				
Argila	Silte	Areia		Classe Textural
		Fina	Grossa	
g Kg				
32	11	24	33	Média

As mudas comerciais de eucalipto (*Eucalyptus urograndis* – Clone 1407) foram adquiridas junto à Agriflora[®] e, antecedendo ao plantio, apresentavam, em média, 32,7 cm de altura, 2,67 mm de diâmetro do coleto, 9 folhas, 0,9 g de massa seca das folhas e 0,55 g de massa seca do caule.

Foi utilizado delineamento experimental de blocos casualizados, com oito repetições, com os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2x8, totalizando 128 parcelas experimentais, no qual constituíram os fatores as duas condições de disponibilidade hídrica (com e sem restrição hídrica) e oito doses de etil-trinexapac (Moddus[®]): 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g. As doses foram propostas com base em trabalhos anteriormente realizados por Pires et al. (2019) e Bacha et al. (2017). Para a manutenção das mudas em condição de restrição hídrica, o monitoramento da umidade do substrato foi feito com o sensor Falker[®] HidroFarm (modelo HFM 2030), considerando valores entre 20-22% para plantas mantidas na ausência de restrição hídrica, e 7-10% (equivalente a uma média de 40% da capacidade de campo) para plantas mantidas em condições de restrição hídrica (Figura 1).

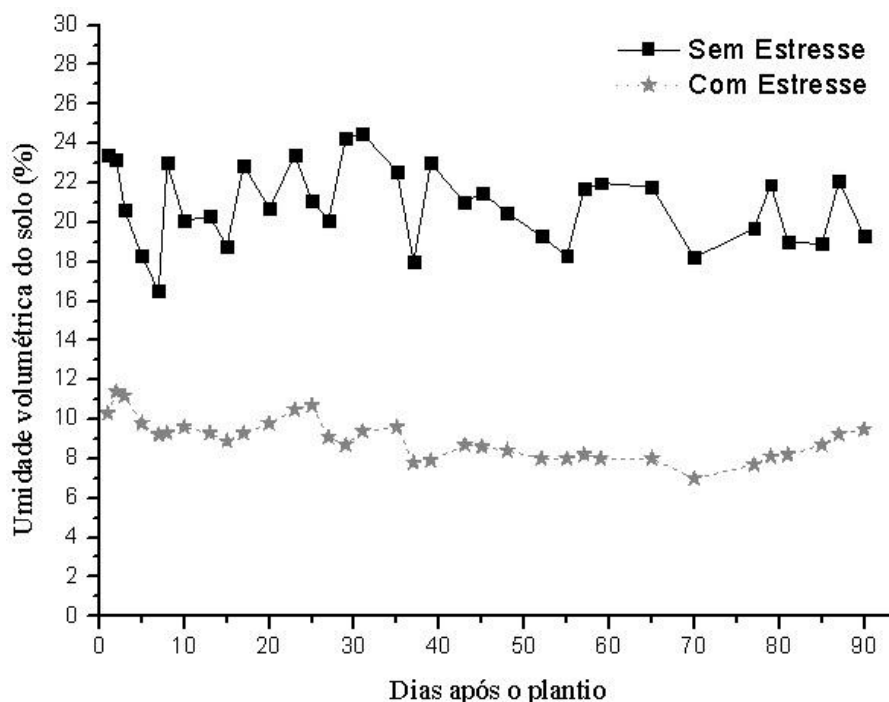


Figura 1. Variação da umidade do solo durante o período experimental. Dados obtidos com o sensor Falker® HidroFarm (modelo HFM 2030). Jaboticabal-SP, 2019.

Antecedendo o plantio, as mudas de eucalipto, ainda acondicionadas em tubetes de 50 mL, foram pulverizadas com etil-trinexapac nas doses anteriormente citadas. Para isso, foi utilizado um pulverizador costal, à pressão constante (CO_2), munido de barra com duas pontas TT 110.02, regulado para gasto de volume de calda de 200 L ha^{-1} . Na ocasião da aplicação, a qual ocorreu em sala de pulverização, a temperatura e a umidade do ar eram de, respectivamente, $27,3^\circ\text{C}$ e 71% (Figura 3).

Vinte e quatro horas após a aplicação do etil-trinexapac, todas as mudas foram plantadas nos vasos, os quais já se encontravam com a umidade do solo controlada, de acordo com cada tratamento.

Com o objetivo de se verificar o efeito do produto nas características fotossintéticas do eucalipto, foram realizadas avaliações de teor relativo de clorofila total, trocas gasosas e eficiência quântica do fotossistema II (FSII). Assim, aos 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 DAP, sempre às nove horas da manhã, foram avaliadas, na terceira folha totalmente expandida, a taxa de assimilação líquida de CO_2 , transpiração, concentração de CO_2 intercelular e condutância estomática, com um

analisador de gás por infravermelho (IRGA, mod. LCpro-SD, ADC BioScientific®). Para tanto, foram utilizadas condições de trabalho de: 19 mmol H₂O mol⁻¹, 398 μmol CO₂ mol⁻¹, a taxa de fluxo em 400 μmol s⁻¹, pressão atmosférica em 1000 KPa e o fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (quantum) em 1100 μmol m⁻² s⁻¹. Nessa mesma folha, também às nove horas da manhã, foram determinados a eficiência quântica do fotossistema II – F_v/F_m (fluorímetro, mod. MINI-PAM-II, Walz®), aos 11, 12, 13, 14 e 15 DAP, e o teor relativo de clorofila total (clorofilômetro, mod. ClorofiLog, Falker®), aos 14, 15, 19, 20, 26, 27 e 28 DAP.

Aos 06, 20, 35, 47, 64, 78 e 90 DAP foram determinados a altura das plantas (com régua graduada em mm) e o diâmetro do caule (utilizando-se paquímetro digital). Ao final do período experimental (90 DAP), as plantas foram cortadas em sua base e suas folhas destacadas para a determinação da área foliar (LiCor®, mod. LI 3100 A). Em seguida, as folhas e os caules foram colocados para secagem em estufa de circulação forçada de ar (70 °C), por 96 horas, para a determinação da massa de matéria seca em balança eletrônica de precisão.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com a utilização do software AgroEstat® (versão 1.1.0.626; Barbosa e Maldonado Jr., 2011). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software Origin v. 9.0 (Microcal®).

3.2. Experimento 2 – Resposta do eucalipto a três doses de etil-trinexapac

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Laboratório de Plantas Daninhas (LAPDA), no mesmo local do experimento 1 (dados meteorológicos do período experimental na Tabela 4).

Tabela 4. Dados meteorológicos durante o período experimental. Jaboticabal-SP, 2019.

Mês (2019)	Pressão (hPa)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Tmed (°C)	UR (%)	Insolação (h)
Setembro	944,6	33,5	18,1	25,0	55,2	242,6
Outubro	942,9	34,5	19,2	26,2	56,2	269,4
Novembro	941,7	31,7	20,1	25,0	70,4	201,2
Dezembro	942,1	30,6	20,5	24,8	76,7	169,1

Pressão: pressão atmosférica; Tmax: temperatura máxima; Tmin: temperatura mínima; Tmed: temperatura média; UR: umidade relativa do ar.

O experimento foi conduzido durante 81 dias após o plantio (DAP) do eucalipto em vasos de 15 litros. Foi utilizado como substrato uma mistura de Latossolo Vermelho Escuro e areia na proporção de 2:1 (v/v), o qual foi submetido às análises química e física de rotina (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Análise química do substrato utilizado nas parcelas experimentais. Jaboticabal-SP, 2019.

pH CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	P resina mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	H+Al mmol _c dm ⁻³	SB	CTC	V %
5,5	9	11	1,3	17	7	14	25,2	39,7	64

Tabela 6. Análise física do substrato utilizado nas parcelas experimentais. Jaboticabal-SP, 2019.

Cabo de São Roque, 2019				
Argila	Silte	Areia		Classe Textural
		Fina	Grossa	
g Kg				
30	03	35	32	Média

As mudas comerciais de eucalipto (*Eucalyptus urograndis* – Clone 1407) foram adquiridas junto à Agriflora® e, antecedendo ao plantio, apresentavam, em média, 39,5 cm de altura, 3,43 mm de diâmetro do coleto, 10 folhas, 1,7 g de massa seca das folhas e 0,87 g de massa seca do caule.

Foi utilizado delineamento experimental em blocos casualizados, com seis repetições, com os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2x3, no qual constituíram os fatores as duas condições de disponibilidade hídrica e as três doses do etil-trinexapac selecionadas no primeiro experimento, são elas: 0, 90, 150 g i.a. ha⁻¹ (Moddus®). Para a manutenção das mudas em condição de restrição hídrica, o monitoramento da umidade do substrato foi feito com o sensor Falker® HidroFarm

(modelo HFM 2030), considerando valores entre 22-24% para plantas mantidas na ausência de restrição hídrica, e 6-9% (equivalente a uma média de 30% da capacidade de campo, adaptado do primeiro experimento) para plantas mantidas em condições de restrição hídrica (Figuras 2).

Cada vaso, com uma planta de eucalipto, foi considerado uma parcela experimental, totalizando 180 parcelas (36 parcelas para cada época de avaliação destrutiva, seguida de coleta dos materiais para as análises laboratoriais).

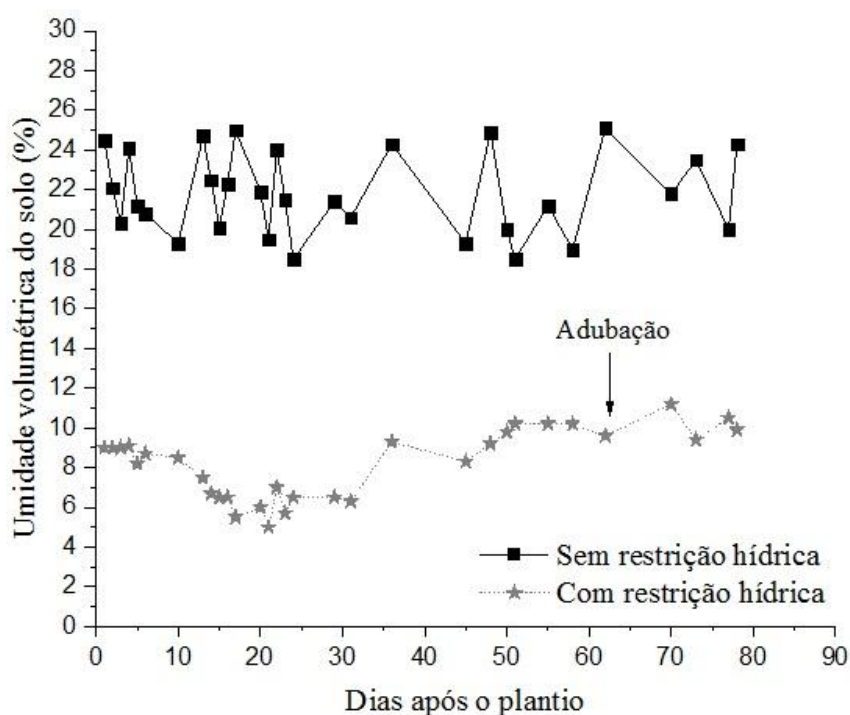


Figura 2. Variação da umidade do solo durante o período experimental. Dados obtidos com o sensor Falker® HidroFarm (modelo HFM 2030). Jaboticabal-SP, 2019.

Antecedendo o plantio, as mudas de eucalipto, ainda acondicionadas em tubetes de 50 mL, foram pulverizadas com etil-trinexapac nas doses anteriormente citadas. Para isso, foi utilizado um pulverizador costal, à pressão constante (CO_2), munido de barra com duas pontas TT 110.02, regulado para gasto de volume de calda de 200 L ha^{-1} . Na ocasião da aplicação, a qual ocorreu em sala de pulverização, a temperatura e a umidade do ar eram de, respectivamente, $24,1^\circ\text{C}$ e 62%.

Vinte e quatro horas após a aplicação do etil-trinexapac, todas as mudas foram plantadas nos vasos, os quais já se encontravam com a umidade do solo controlada, de acordo com cada tratamento.

Aos 02, 03, 04, 05 e 06 DAP, às 9:00; 11:00; 13:00; 15:00; e 17:00 horas, na terceira folha totalmente expandida, foram realizadas avaliações de eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m - fluorímetro, mod. MINI-PAM-II, Walz®), taxa de assimilação líquida de CO₂, taxa de transpiração, concentração de CO₂ intercelular e condutância estomática, com um analisador de gás por infravermelho (IRGA mod. LI-6400, Li-Cor®). Para tanto, foram utilizadas condições de trabalho de: 19 mmol H₂O mol⁻¹, 398 μ mol CO₂ mol⁻¹, a taxa de fluxo em 300 μ mol s⁻¹, pressão atmosférica em 1000 KPa e o fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (quantum) variou entre 200 e 1500 μ mol m⁻² s⁻¹, de acordo com o horário da medição. Nesses mesmos dias, também foi determinado o teor relativo de clorofila total (Clorofilômetro, mod. ClorofiLOG, Falker®).

Foram realizadas avaliações destrutivas (juntamente com a coleta dos materiais para as análises de metabolômica) aos 8, 14, 21, 42 e 81 DAP. Para tanto, o material vegetal coletado (terceira folha totalmente expandida) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, macerado (para obter partículas <60 μ m), liofilizado, pesado e armazenado a -80 °C para as análises de metabolismo primário.

Após as coletas, as avaliações destrutivas seguiram da seguinte maneira: as plantas foram cortadas em sua base e suas folhas destacadas para a determinação da área foliar (LiCor®, mod. LI 3100 A). Em seguida, folhas e caules foram submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar (70 °C), por 96 horas, para a determinação da massa de matéria seca em balança eletrônica de precisão.

Aos 62 e 64 DAP, todos os vasos foram adubados com 60 mL de solução de ureia a 0,5%, seguido de 400 mL de água extra, para os vasos que se encontravam sob restrição hídrica. Aos 65 DAP, todos os vasos receberam 100 mL de solução nutritiva completa de Hoagland e Arnon (1950).

Aos 03, 16, 31, 44, 56, 65 e 81 DAP, foram determinadas a altura das plantas (com régua graduada em mm) e o diâmetro do caule (utilizando-se paquímetro digital). Ao final do período experimental (81 DAP), as plantas foram cortadas em

sua base e submetidas ao processo de mensuração de área foliar e massa de matéria seca, anteriormente descritos.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com a utilização do software AgroEstat[®] (versão 1.1.0.626; Barbosa e Maldonado Jr., 2011). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software Origin v. 9.0 (Microcal[®]).

3.3. Análise de compostos do metabolismo primário

Preparação dos extratos

A preparação dos extratos para isolamento dos metabolitos foi realizada a partir de 50 mg de folhas de eucalipto coletadas aos 8, 14, 21, 42 e 81 DAP, após congelamento em nitrogênio líquido, maceração e liofilização, segundo metodologia proposta por Kim et al. (2010).

Após armazenamento do material vegetal em eppendorfs de 2 mL, foi preparada solução tampão, adicionando 1,232 g de KH_2PO_4 + 10 mg de TSP- d_4 (sal de sódio do ácido trimetilsililpropiónico, Sigma-Aldrich[®]), em 100 mL de água deuterada (D_2O – óxido de deutério, Sigma-Aldrich[®]). O pH da solução foi corrigido para 5,94 com a adição de 14 gotas de NaOH 1,0 M.

Para a preparação dos extratos para a análise do perfil dos metabólitos, foram adicionados aos eppendorfs 750 μL de solução tampão, seguido de 750 μL de Metanol- d_4 (CD_3OD) 99,8% (Cambridge Isotope Laboratories Inc.[®]). Os conteúdos dos tubos foram misturados utilizando um agitador de tubos Vortex Phoenix[®] durante 30 segundos e as amostras foram deixadas em banho de ultrassom por 20 min (Unique[®], mod. Ultra Cleaner 1600) em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Em seguida, os resíduos vegetais contidos nos eppendorfs foram sedimentados com a utilização de uma centrífuga de bancada (Novatecnica[®], mod. NT816), que trabalhou durante 25 minutos, em 14.000 rotações por minuto (RPM), também a 25°C . O sobrenadante (1400 μL) foi transferido para tubos de eppendorf de 2 mL e armazenados em freezer (-20°C) durante 10 dias. Após esse período, 800 μL dos extratos foram transferidos os tubos de RMN de 5 mm, previamente identificados, para posterior análise de ressonância magnética nuclear). Outra alíquota de

sobrenadante (100 μ L) foi recolhida para as amostras de controle de qualidade (QC-sample), de acordo com metodologia proposta por Kim et al. (2010).

A preparação dos extratos foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal da FCAV/UNESP – Jaboticabal-SP, em quatro repetições, e levadas até a EMBRAPA Instrumentação, em São Carlos-SP, para a realização das análises de compostos do metabolismo primário via ressonância magnética nuclear.

Experimentos de ^1H -RMN e 2D-RMN

Todos os experimentos de RMN foram realizados a 298 K em um espectrômetro de RMN AVANCE III HD 600 (Bruker® Corporation, Billerica, Massachusetts, USA) operando a 14,1 T, observando ^1H e ^{13}C a 600,13 e 150,90 MHz, respectivamente (Figura 4.3). O espectrômetro foi equipado com uma sonda de detecção multinuclear de 5 mm com *z-gradient*. A amostra de controle de qualidade (QC-sample) foi usada para calibrar o correto comprimento de pulso de 90° , para determinar o deslocamento do sinal de água para a supressão de água e para monitorar a aquisição periodicamente. Os espectros de ^1H -RMN (256 transientes e 32 K data points) foram adquiridos com a utilização do software ICON para automação de parâmetros de aquisição, usando sequência de pulso 1D NOESY-presat (*noesypr1d*) em uma largura espectral de ~ 20 ppm e RG de 64. Para a aquisição de espectros 1D NOESY-presat, 0,73 Hz/ponto foi usada, com um tempo de aquisição (AQ) de 1,36 s, largura de pulso de 90° (PW) de 11,5 μ s, um tempo de mistura de 100 ms e "relaxation delay" de 2 s. Experimentos de correlação de RMN de ^1H - ^{13}C de uma ligação (HSQC) e de longo alcance (HMBC) foram otimizados para constantes de acoplamento médios $^1J_{(\text{H,C})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente. Os espectros foram processados usando o software TopSpin 3.5. Todos os desvios químicos de ^1H e ^{13}C NMR foram observados em ppm em relação ao sinal TSP a 0,00 ppm como uma referência interna e um alargamento de linha exponencial de 0,3 Hz foi aplicado. Após a transformação de Fourier, os espectros foram faseados manualmente (zero e primeira fase) e a linha de base foi corrigida. Os metabolitos serão atribuídos com base nos deslocamentos químicos, multiplicidades de sinal, integrais e literatura.

Análise estatística

A análise multivariada dos espectros de 119 ^1H -RMN foi conduzida usando o software SIMCA 14.1. Quatro replicatas técnicas de um pool de plantas colhidas aos 8, 14, 21, 42 e 81 DAP foram utilizadas. As amostras foram carregadas aleatoriamente no espectrômetro de RMN e oito espectros de amostra de controle de qualidade (QC-sample) foram adquiridos e incluídos no conjunto de dados para verificar a reprodutibilidade. Para o pré-tratamento, baldes retangulares simples de 0,04 ppm foram calculados com o software AMIX usando o modo de integração especial e escalonando para a intensidade total. A análise incluiu as regiões entre -0,01 e 10,5 ppm, excluindo o sinal residual de água (4,75 a 4,90 ppm), metanol (3,28 a 3,35 ppm) e TSP (-0,01 a 0,15 ppm).

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada com a utilização do software SIMCA-P (Umetrics, Umeå, Sweden), usando o pré-processamento de escalonamento de Pareto para o conjunto de dados (127 espectros $\times$ 263 colunas).

Para avaliar o efeito do etil-trinexapac nas plantas de eucalipto, foi elaborado outro PCA, em que foram incluídas apenas as amostras que não sofreram deficiência hídrica, dando uma matriz de 68 espectros $\times$ 263 colunas. Além deste, outro PCA foi realizado apenas com as amostras da época de coleta aos 42 DAP, sem o grupo QC-sample, a partir de uma matriz gerada de 12 espectros $\times$ 263 colunas.

Uma análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada para detectar os principais metabólitos que influenciaram na separação dos grupos selecionados. Em um primeiro momento, para detectar as principais diferenças causadas pelo estresse hídrico, foi realizado um modelo incluindo todas as amostras dos tratamentos coletados aos 21 DAP e 42 DAP. O modelo possui 267 variáveis, em que 263 são variáveis X e 4 são variáveis Y, enquanto 5 componentes foram calculados para explicar o modelo.

Para detectar as principais diferenças causadas pela influência do etil-trinexapac nas amostras, foi calculado outro modelo de PLS-DA, testando separadamente o grupo coletado aos 21 DAP, que não sofreram estresse hídrico. O modelo obteve 266 variáveis, sendo 263 variáveis X e 3 variáveis Y.

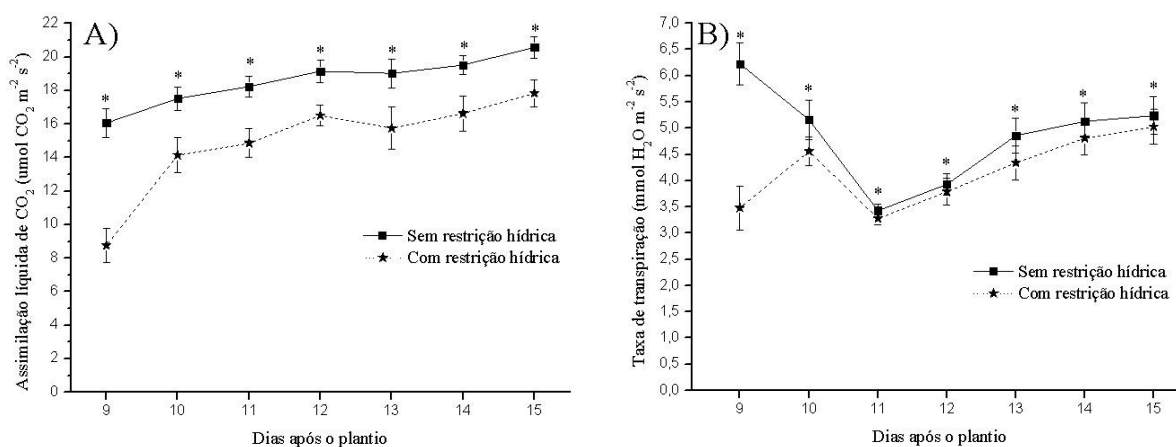
A Análise de rotas metabólicas foi realizada usando a ferramenta online MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>), com a utilização do Teste Hipergeométrico como método de enriquecimento. A análise da topologia foi realizada por "Relative-betweenness Centrality" e a biblioteca de rotas metabólicas utilizada foi a da *Arabidopsis thaliana*.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1 – Curva dose-resposta

Trocas gasosas

Comparando as condições hídricas, considerando a média das doses de etil-trinexapac, foi possível observar que para as variáveis de taxa de assimilação líquida de CO_2 , taxa de transpiração e condutância estomática (Figuras 3-A, 3-B e 3-C, respectivamente), as plantas mantidas sem restrição hídrica apresentaram maiores valores em todas as datas avaliadas. Já para a concentração de CO_2 intercelular (Figura 3-D), os resultados foram diferentes, sendo que apenas aos 09 DAP os eucaliptos cultivados em capacidade de campo obtiveram maiores valores. Assim, a partir de 11 DAP, as plantas sob restrição hídrica apresentaram maior concentração de CO_2 interno, provavelmente devido à menor condutância estomática e assimilação de CO_2 (Figuras 3-A e 3-C).



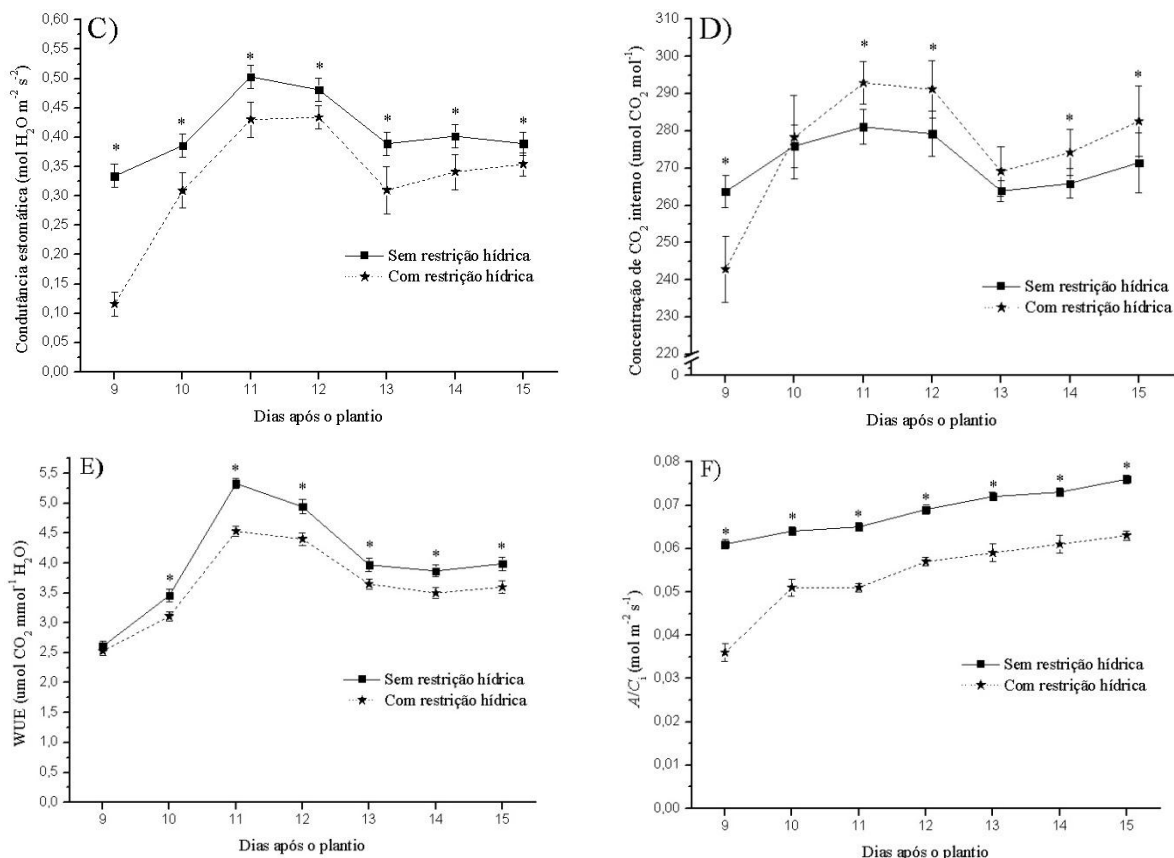


Figura 3. Assimilação líquida de CO_2 (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C), concentração de CO_2 interno (D), eficiência do uso da água (E) e eficiência de carboxilação instantânea (F) de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

A redução na taxa de transpiração e o aumento na condutância estomática (Figuras 3-B e 3-C, respectivamente), observados aos 11 e 12 DAP para ambas condições hídricas, provavelmente estão relacionados às condições climáticas nesses dias, que se encontravam com o céu coberto por nuvens. Apesar disso, é possível notar que a taxa de assimilação líquida não foi afetada, com médias de 18,5 e 15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (Figura 3-A).

No que tange à eficiência do uso da água, a partir dos 10 DAP, as plantas conduzidas sem restrição de água apresentaram valores superiores às aquelas mantidas em irrigação controlada (Figura 3-E). Já para a eficiência de carboxilação instantânea, o padrão de resposta foi similar ao observado para a taxa de

assimilação líquida de CO₂, com diferença significativa em todos os dias de avaliação (Figura 3-F).

Comparando as doses de etil-trinexapac na condição sem restrição hídrica, foi observado que nenhuma delas diferiram entre si ($p < 0,05$ – dados não apresentados), para todas as variáveis de trocas gasosas avaliadas (Figuras 4-A a 4-D). Novamente pôde-se observar a variação ocorrida aos 11 e 12 DAP para taxa de transpiração e condutância estomática, anteriormente citada.

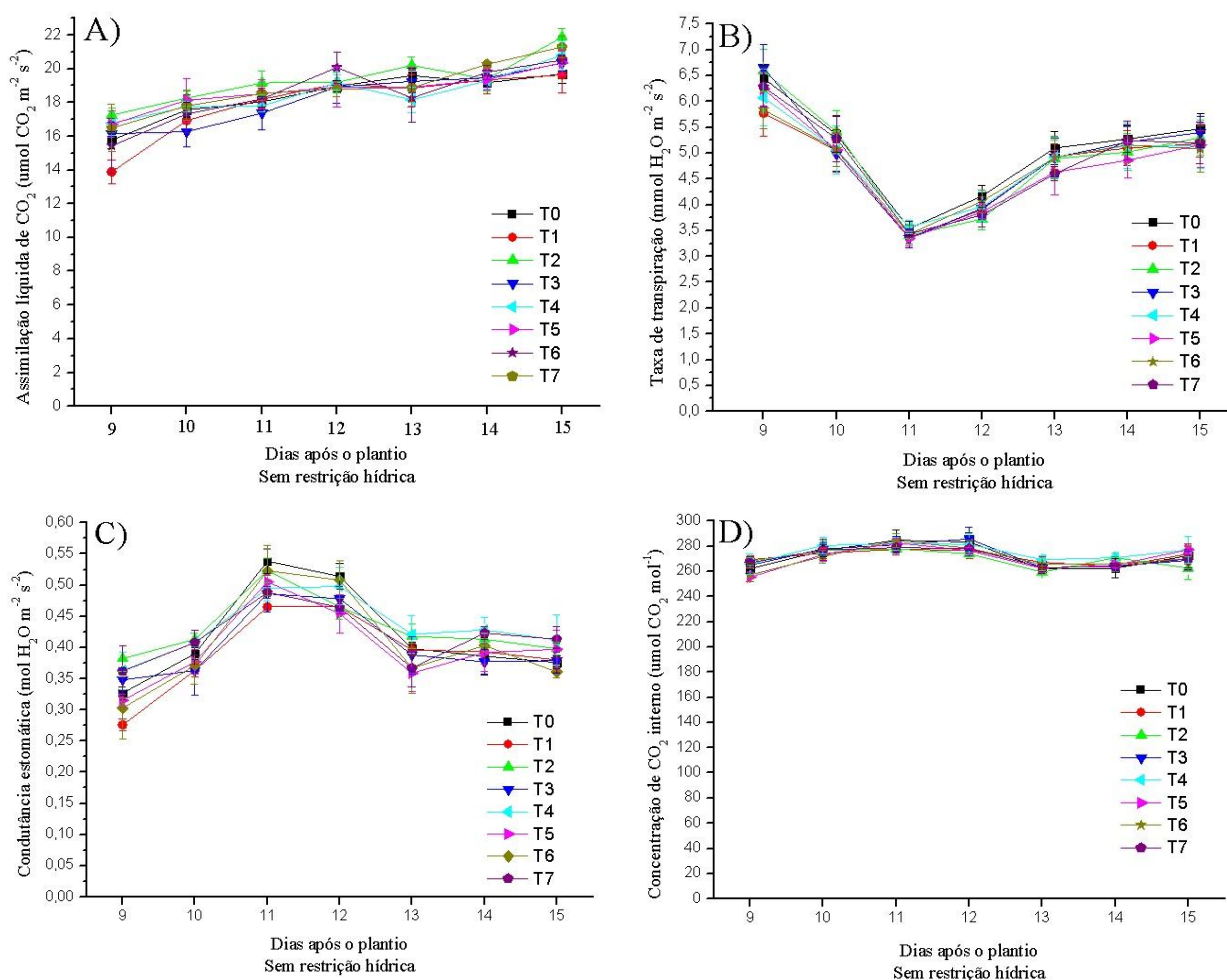


Figura 4. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sem restrição hídrica. T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

Em relação às trocas gasosas para as plantas cultivadas sob restrição hídrica (Figura 5), algumas diferenças entre as doses foram encontradas ($p < 0,05$ – dados não apresentados): aos 09 DAP, o tratamento T2 apresentou valores de taxa de assimilação líquida de CO₂, transpiração e condutância estomática maiores que as doses T6 e T7 (Figuras 5-A a 5-C); na avaliação seguinte, o tratamento T6, com o menor valor, diferiu significativamente da testemunha para a taxa de transpiração, mas não das demais doses (Figura 5-B); já aos 12 DAP, foi observado o inverso para a concentração de carbono interno, em que o T0, com o menor valor, distinguiu

do T6 e T3, os quais não diferiram entre si (Figura 5-D). Nas demais avaliações não houve diferença entre as doses de etil-trinexapac testadas.

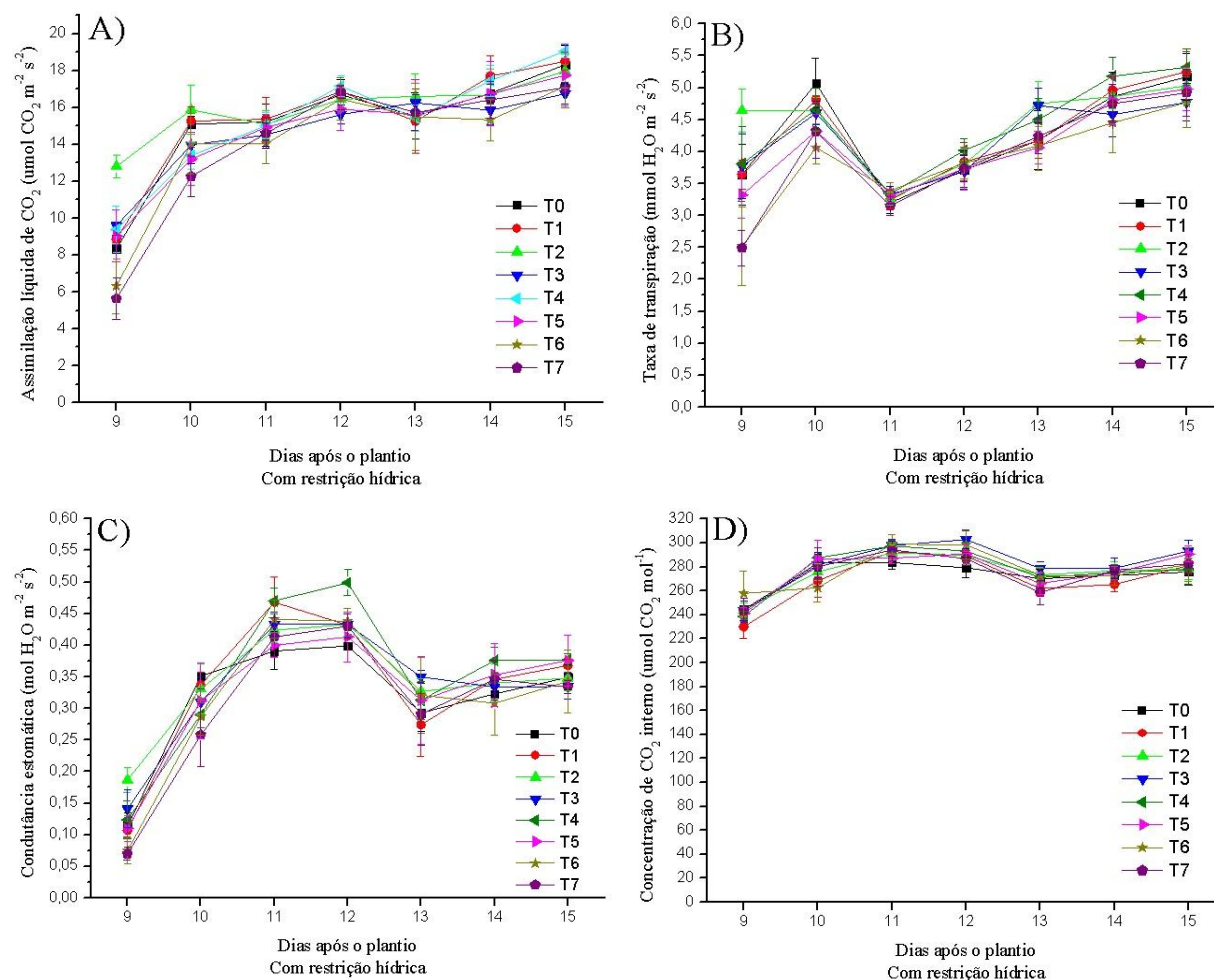


Figura 5. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas com restrição hídrica (40% da capacidade de campo). T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

Eficiência Quântica do Fotossistema II

No que tange à eficiência quântica do fotossistema II, foi observada diferença entre as condições hídricas nas avaliações realizadas aos 11 e 13 DAP, em que os eucaliptos cultivados sem restrição de irrigação obtiveram os maiores valores para essa característica (Figura 6).

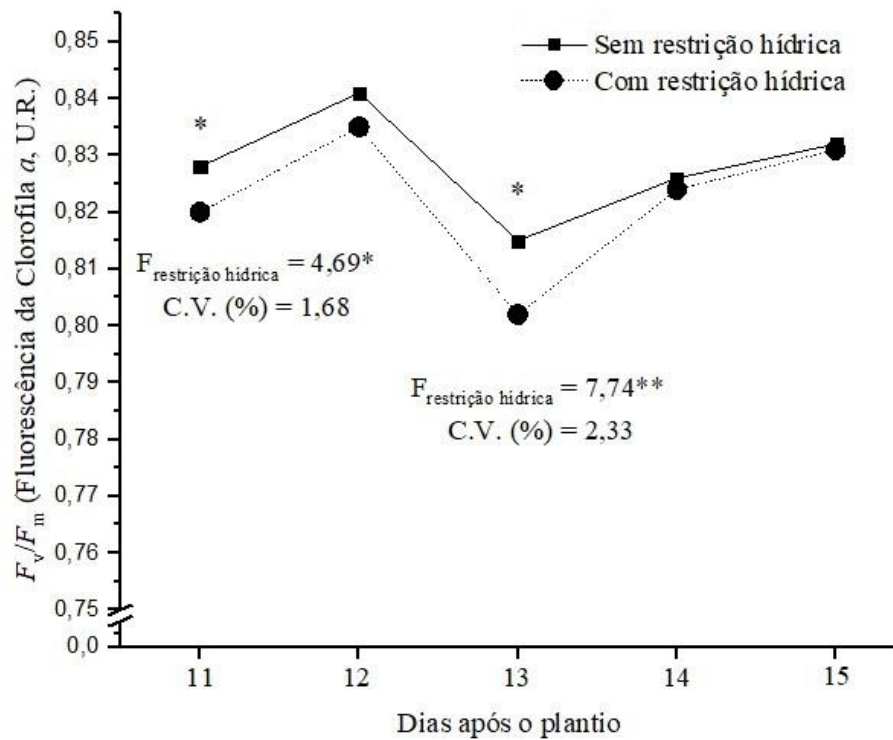


Figura 6. Eficiência quântica do Fotossistema II de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

Comparando o efeito das diferentes doses de etil-trinexapac em cada condição hídrica isoladamente, novamente não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figuras 7-A e 7-B). Apesar disso, vale ressaltar os altos valores de F_v/F_m anotados em todos os dias de avaliação, acima de 0,80.

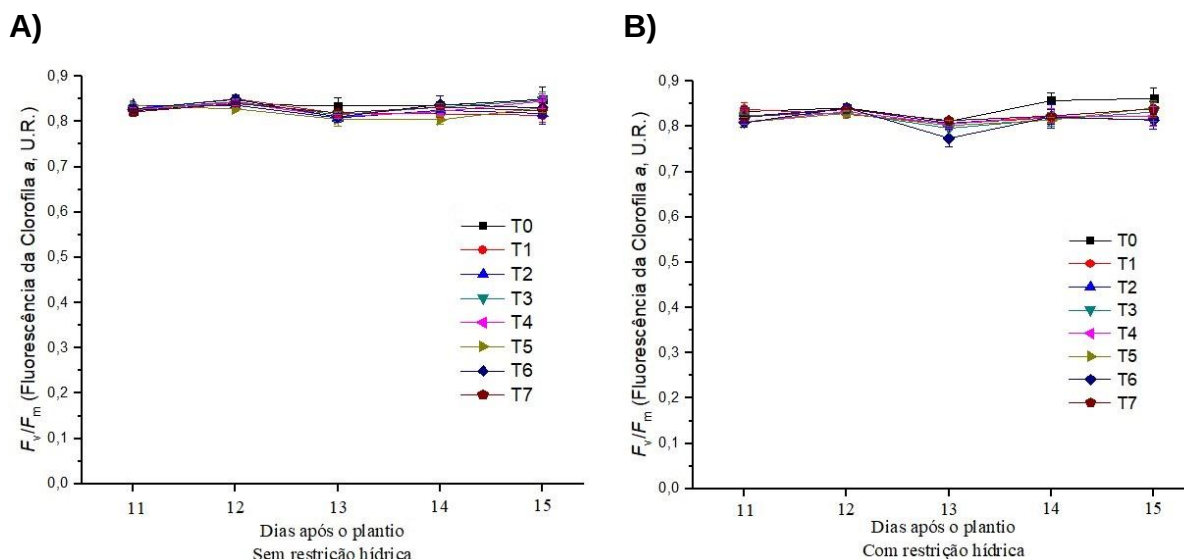


Figura 7. Eficiência quântica do Fotossistema II de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sem (A) e com (B) restrição hídrica (40% da capacidade de campo). T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

Teor relativo de Clorofila Total

Em relação ao teor de clorofila total, o qual foi avaliado por um maior período de tempo, foi observada uma inversão nos valores anotados, quando comparando as condições hídricas utilizadas. Até os 19 DAP, as plantas de eucalipto que estiveram em capacidade de campo apresentaram maiores valores para esta característica (Figura 8 e Tabela 7). Já aos 20 DAP, não mais foi observada diferença entre as condições hídricas. A partir deste ponto, as plantas que foram conduzidas sob restrição de água passaram a acumular, proporcionalmente, maior quantidade de clorofila em suas folhas (Figura 8 e Tabela 7).

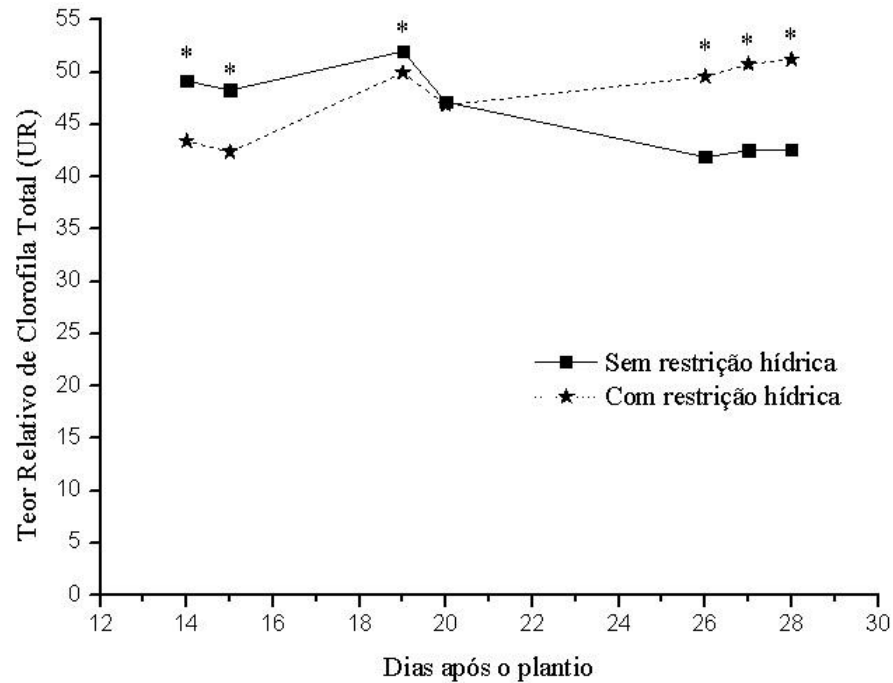


Figura 8. Teor relativo de clorofila total de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

Em relação às doses de etil-trinexapac testadas, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos adotados, para nenhuma das épocas de avaliação (Tabela 7).

Tabela 7. Teor Relativo de Clorofila Total (UR) aos 14, 15, 19, 20, 26, 27 e 28 dias após o plantio (DAP) de mudas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), submetidas à aplicação de doses crescentes de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

Tratamentos	14 DAP	15 DAP	19 DAP	20 DAP	26 DAP	27 DAP	28 DAP
Condição hídrica (CH)							
Sem Estresse	49,2 A	48,3 A	51,9 A	47,2	41,9 B	42,5 B	42,6 B
Com Estresse	43,4 B	42,4 B	49,9 B	46,9	49,5 A	50,8 A	51,2 A
Doses (g i.a. ha ⁻¹ de etil-trinexapac)							
0	47,1	45,7	50,1	47,4	45,9	46,9	46,8
15	46,5	45,6	53,6	47,7	46,8	47,2	47,8
30	47,7	46,5	50,5	48,2	46,4	47,9	48,3
60	46,5	46,7	52,1	44,7	42,1	46,1	45,9
90	43,1	43,7	50,1	47,9	46,2	47,2	46,8
120	46,7	46,6	51,2	46,9	45,4	46,7	46,4
150	46,8	41,3	49,1	45,4	46,5	46,8	48,3
300	45,9	46,5	51,2	47,6	46,3	44,5	44,9
F (CH)	53,2**	16,1**	5,32*	0,08 ^{ns}	78,8**	82,3**	94,1**
F (Doses)	1,61 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,23 ^{ns}	0,85 ^{ns}	1,52 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,93 ^{ns}
F (CH x D)	1,35 ^{ns}	1,05 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,72 ^{ns}	1,47 ^{ns}
C.V. (%)	6,78	12,9	6,90	8,14	7,57	7,79	7,55

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * e ** = valores significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. ^{ns} = valor não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. C.V. = Coeficiente de Variação.

Crescimento

Para a altura das plantas de eucalipto cultivadas em capacidade de campo, foi possível observar que a partir da avaliação realizada aos 35 DAP, plantas do tratamento com 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac já passaram a se destacar das demais doses, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos tratamentos T0 à T4 até os 78 DAP (Figura 9-A). No entanto, ao final do experimento (90 DAP), somente a dose de 30 g i.a. ha⁻¹ (T2) distinguiu daquela com maior valor de altura (T6) (Figura 9-A e Tabela 9-A).

No que tange ao diâmetro das plantas, novamente a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ foi a que apresentou maior estímulo ao crescimento, diferindo de T0 a partir de 78 DAP e mantendo-se até o final do experimento (Figura 9-B). As demais doses não se mostraram suficientes para aumentar o diâmetro do eucalipto, igualando-se à testemunha em todas as avaliações (Figura 9-B).

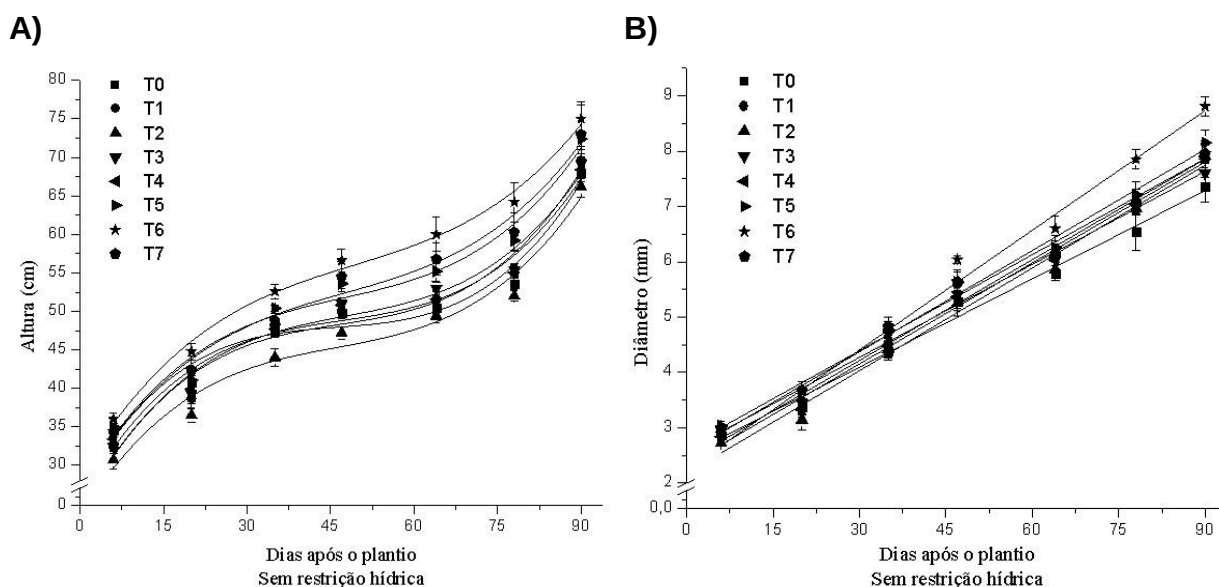


Figura 9. Altura (A) e diâmetro (B) de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sem restrição hídrica. T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). Jaboticabal-SP, 2021.

Em relação aos eucaliptos cultivados sob restrição hídrica, o tratamento T7 foi o que proporcionou maior crescimento em altura, diferindo da testemunha sem aplicação na avaliação realizada aos 78 DAP (Figura 10-A).

Para o diâmetro, não houve diferença entre os tratamentos durante todo o período experimental (Figura 10-B).

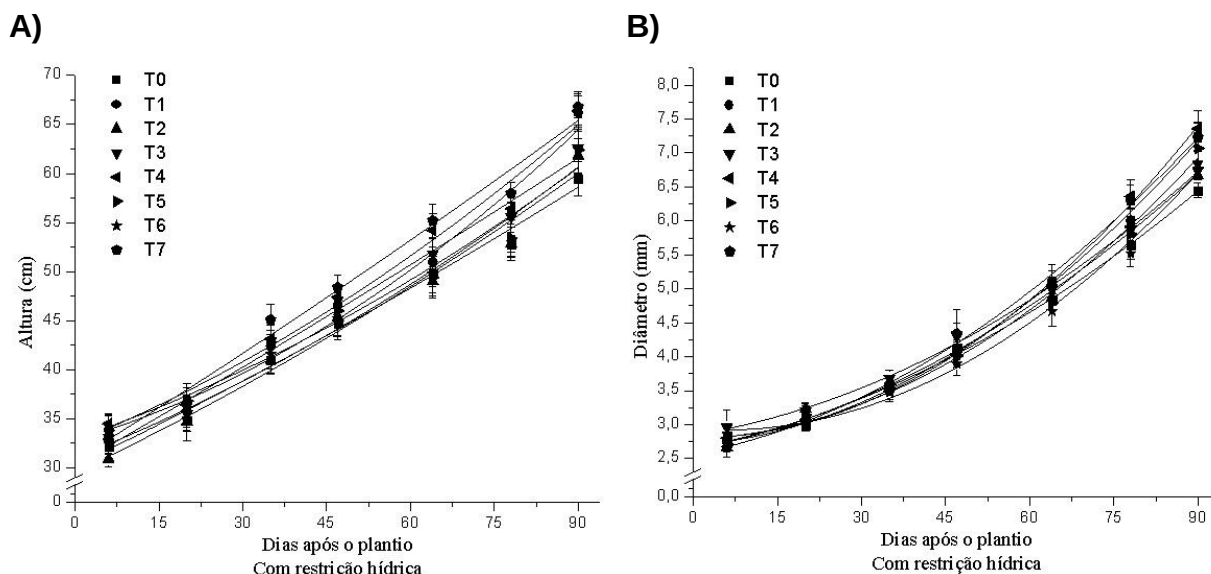


Figura 10. Altura (A) e diâmetro (B) de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas com restrição hídrica (40% da capacidade de campo). T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

Ao final do experimento (90 DAP), quando comparado as condições hídricas para o diâmetro, observou-se que as plantas cultivadas sem restrição de água obtiveram crescimento 14,2% maior que aquelas sob restrição hídrica (Tabela 8). Em relação às doses, independentemente da condição hídrica, para a mesma época de avaliação, notou-se que os tratamentos T4 e T6 foram os únicos que diferiram da testemunha sem aplicação, sendo, em média, 10,3% maiores (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito de doses crescentes de etil-trinexapac sobre a altura (cm), diâmetro (mm), massa seca do caule (MSCaule – g), massa seca das folhas (MSFolhas – g), área foliar (cm²) e massa seca total (MSTotal – g) de mudas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), aos 90 dias após o plantio. Jaboticabal-SP, 2021.

Tratamentos	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	MSCaule (g)	MSFolhas (g)	Área Foliar (cm ²)	MSTotal (g)
Condição hídrica (CH)						
Sem Estresse	70,2	7,94 A	9,43	16,2	1195,7	25,7
Com Estresse	63,5	6,95 B	7,43	14,1	1200,7	21,5
Doses (g i.a. ha ⁻¹ de etil-trinexapac)						
0	63,7	6,90 B	7,03	13,1	1056,6	20,1
15	67,9	7,55 AB	8,92	15,3	1258,9	24,3
30	64,1	7,28 AB	8,15	15,3	1206,5	23,5
60	65,9	7,17 AB	8,13	15,4	1197,1	22,9
90	67,4	7,63 A	8,27	14,7	1204,7	22,9
120	67,4	7,60 AB	8,61	15,3	1191,2	23,1
150	68,7	7,82 A	9,18	15,8	1202,3	25,1
300	69,9	7,59 AB	9,17	16,3	1268,4	25,5
F (CH)	65,9**	75,3**	48,2**	21,5**	0,01 ^{ns}	32,4**
F (Doses)	3,45**	3,48**	3,06**	1,99 ^{ns}	1,05 ^{ns}	2,42*
F (CH x D)	2,28*	1,98 ^{ns}	5,29**	2,94*	2,40*	3,94**
C.V. (%)	5,53	6,87	15,2	14,2	16,5	14,1

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * e ** = valores significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. ^{ns} = valor não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). CH = Condição Hídrica; C.V. = Coeficiente de Variação.

Para todas as características que apresentaram desdobramento entre os fatores “condição hídrica” X “doses de etil-trinexapac”, não houve diferença entre as doses quando as plantas estavam sob restrição hídrica (Tabelas 9-A, 9-B, 9-C, 9-D e 9-E).

No entanto, para a altura avaliada ao final do período experimental (90 DAP), quando em condições de capacidade de campo, foi observada diferença entre as doses de 150 g i.a. ha⁻¹, com o maior valor, e 30 g i.a. ha⁻¹, com o menor valor. Os demais tratamentos obtiveram desenvolvimento intermediário e não diferiram entre si (Tabela 9-A). Em relação às condições hídricas, os tratamentos T1, T2 e T4 foram os únicos que não apresentaram diferença significativa.

No que tange à massa seca do caule, as doses de 0, 15, 30 e 90 g i.a. ha⁻¹ não diferiram quanto às condições hídricas impostas, ao contrário das demais (Tabela 9-B). Comparando-se as doses dos eucaliptos sem restrição de água, foi possível observar que as três maiores foram as únicas que diferiram da testemunha

sem aplicação (Tabela 9-B), assim como para a massa seca das folhas e massa seca total (Tabelas 9-C e 9-E, respectivamente), o que fez com que elas também diferissem das plantas pulverizadas com as mesmas doses, mas conduzidas sob irrigação controlada.

Tabela 9. Médias da interação entre os fatores “condição hídrica” X “doses de etil-trinexapac” para a altura (A), massa seca do caule (B), massa seca das folhas (C), área foliar (D) e massa seca total (E) de mudas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de doses crescentes de etil-trinexapac. Jaboticabal-SP, 2021.

A) Altura (cm)									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	F
Sem Restrição	68,1 A	69,7 A	66,2 A	69,2 A	68,4 A	72,4 A	75,1 A	73,1 A	3,19**
Com Restrição	ab	ab	b	ab	ab	ab	a	ab	
Sem Restrição	59,5 B	66,2 A	61,8 A	62,6 B	66,4 A	62,4 B	62,4 B	66,8 B	2,54 ^{ns}
Com Restrição	a	a	a	a	a	a	a	a	
F	13,2**	2,11 ^{ns}	3,54 ^{ns}	7,96**	0,73 ^{ns}	18,3**	29,1**	7,03*	---
B) MSCaule (g)									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	F
Sem Restrição	7,33 A	9,72 A	8,40 A	9,03 A	8,15 A	10,6 A	11,8 A	10,4 A	6,65**
Com Restrição	c	abc	bc	bc	bc	ab	a	ab	
Sem Restrição	6,73 A	8,12 A	7,91 A	7,24 B	8,39 A	6,59 B	6,54 B	7,97 B	1,71 ^{ns}
Com Restrição	a	a	a	a	a	a	a	a	
F	0,55 ^{ns}	3,86 ^{ns}	0,37 ^{ns}	4,88*	0,09 ^{ns}	24,7**	42,2**	8,75**	---
C) MSFolhas (g)									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	F
Sem Restrição	13,2 A	16,4 A	15,3 A	15,9 A	14,8 A	17,9 A	18,8 A	17,9 A	3,80**
Com Restrição	b	ab	ab	ab	ab	a	a	a	
Sem Restrição	12,9 A	14,3 A	15,3 A	14,8 A	14,7 A	12,7 B	12,8 B	14,7 B	1,14 ^{ns}
Com Restrição	a	a	a	a	a	a	a	a	
F	0,03 ^{ns}	2,23 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,02 ^{ns}	14,5**	18,8**	5,98*	---
D) Área Foliar (cm ²)									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	F
Sem Restrição	930,98	1253,5	1144,1	1179,9	1122,7	1288,7	1373,7	1272,2	2,33*
Com Restrição	Bb	Aab	Aab	Aab	Aab	Aab	Aa	Aab	
Sem Restrição	1182,2	1264,5	1268,9	1214,3	1286,7	1093,7	1030,8	1264,5	1,11 ^{ns}
Com Restrição	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Ba	Aa	
F	4,03*	0,01 ^{ns}	1,01 ^{ns}	0,08 ^{ns}	1,72 ^{ns}	2,43 ^{ns}	7,51**	0,01 ^{ns}	---
E) MSTotal (g)									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	F
Sem Restrição	20,5 A	26,1 A	23,7 A	24,9 A	22,9 A	28,5 A	30,7 A	28,3 A	5,05**
Com Restrição	c	abc	bc	abc	bc	ab	a	ab	
Sem Restrição	19,7 A	22,4 A	23,2 A	22,1 A	23,1 A	19,3 B	19,4 B	22,5 B	1,31 ^{ns}
Com Restrição	a	a	a	a	a	a	a	a	
F	0,15 ^{ns}	2,98 ^{ns}	0,05 ^{ns}	1,84 ^{ns}	0,01 ^{ns}	19,2**	28,3**	7,43**	---

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * e ** = valores significativos a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. ^{ns} = valor não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 equivalem às doses de, respectivamente, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 300 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus[®]).

Em relação à área foliar, notou-se que o tratamento T6 foi o que proporcionou maior incremento à essa característica, sendo a única dose a diferir da testemunha e da condição com restrição hídrica (Tabela 9-D). No entanto, vale ressaltar que as

plantas não pulverizadas com etil-trinexapac, mas que foram cultivadas com água em abundância, obtiveram menores valores de área foliar quando comparadas ao mesmo tratamento sob irrigação controlada (Tabela 9-D).

Considerando o modelo polinomial de segunda ordem para a massa seca total das plantas sem restrição hídrica, foi observado que a dose que proporcionaria o maior efeito estimulatório ao crescimento do eucalipto seria a de 195 g i.a. ha⁻¹ (Figura 11). Apesar do efeito positivo às plantas, não foi possível observar a resposta característica da *hormesis*, que é particularizada como sendo um efeito estimulatório seguido de um efeito inibitório (resposta bifásica), pois no presente trabalho, apesar das altas doses de etil-trinexapac utilizadas, não houve efeito negativo ao crescimento das plantas (Figura 11).

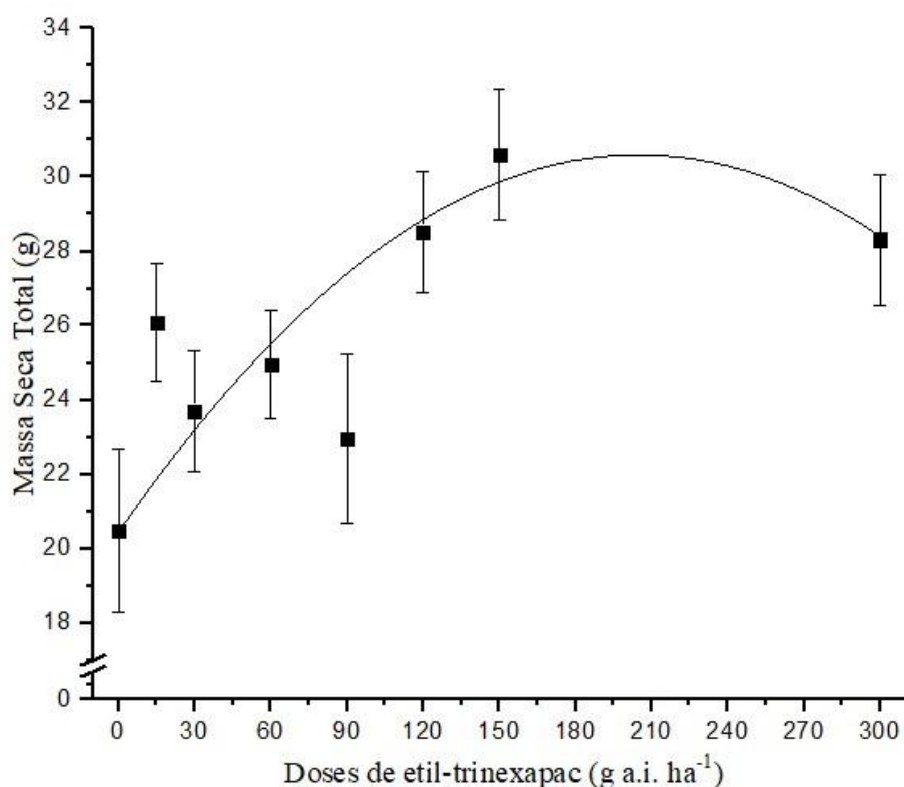


Figura 11. Massa seca total de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) pulverizadas com diferentes doses de doses de etil-trinexapac e cultivadas durante 90 dias, sem restrição hídrica. $Y = 20,4 + 0,09x - 0,0002x^2$; $R^2 = 0,96$. Jaboticabal-SP, 2021.

Quando os dados de matéria seca dos eucaliptos foram transformados para porcentagem da testemunha sem aplicação, foi observado que as três maiores

doses, as quais foram as únicas a diferirem estatisticamente do tratamento T0, obtiveram incremento médio de 45% em seu crescimento (Figura 12).

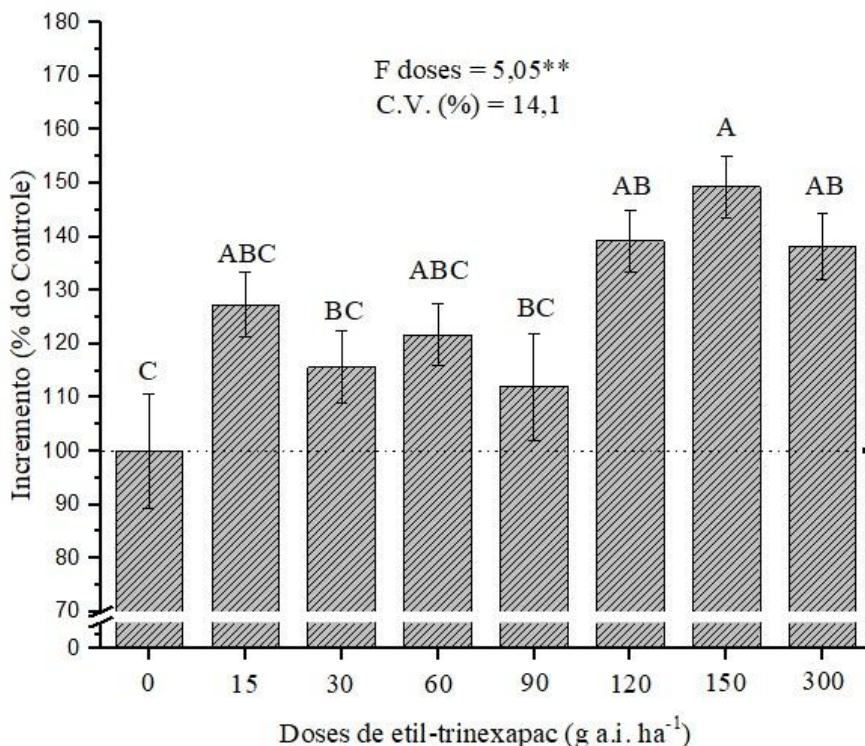


Figura 12. Massa seca total de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) pulverizadas com diferentes doses de doses de etil-trinexapac e cultivadas durante 90 dias, sem restrição hídrica. Dados transformados para porcentagem em relação à testemunha. Jaboticabal-SP, 2021.

4.2. Experimento 2 - Resposta do eucalipto a três doses de etil-trinexapac

Trocas gasosas

Para as avaliações de trocas gasosas realizadas dos 02 aos 06 primeiros dias após a aplicação (DAA) do produto na condição sem restrição hídrica, observou-se um mesmo padrão de resposta quanto as doses aplicadas, para as variáveis de A , E , g_s e C_i . De maneira geral, as plantas tratadas com 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac apresentaram menores valores que as demais doses, as quais não diferiram entre si (Figuras 13 a 17).

Em relação às horas do dia, a taxa de assimilação líquida de CO₂ sempre tendeu a apresentar maiores valores nas primeiras horas da manhã, com redução gradual até às 17 horas (Figuras 13 a 17). Vale ressaltar a exceção observada aos

04 dias após o plantio do eucalipto (DAP), em que o dia amanheceu nublado (PAR = 400), tendo, com isso, ocorrido o pico na assimilação de CO₂ às 11 horas (Figura 13-A).

Para a taxa de transpiração, os maiores valores foram anotados sempre nas avaliações realizadas nos períodos mais quentes do dia (11 ou 13 horas), com exceção aos 03 DAP, quando o céu ficou encoberto por nuvens de poeira, que também refletiu nos menores valores de radiação fotossinteticamente ativa (PAR = 600, 600 e 200) (Figuras 14-A e 14-B).

A variável de concentração de carbono intercelular foi a que apresentou menor variação ao decorrer do dia bem como em relação às doses de etil-trinexapac aplicadas (Figuras 13-D a 17-D).

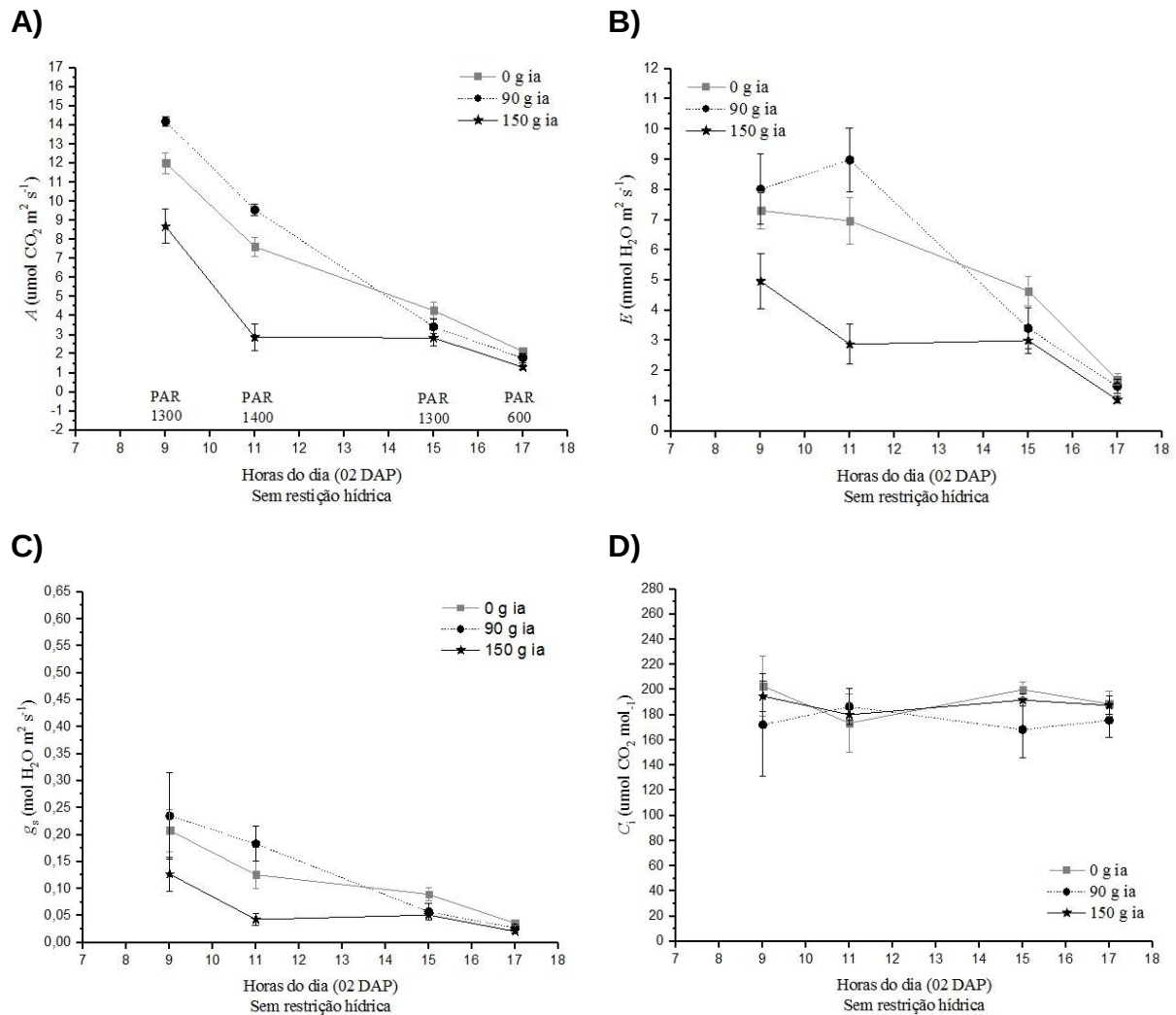


Figura 13. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sem restrição hídrica, aos 02 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

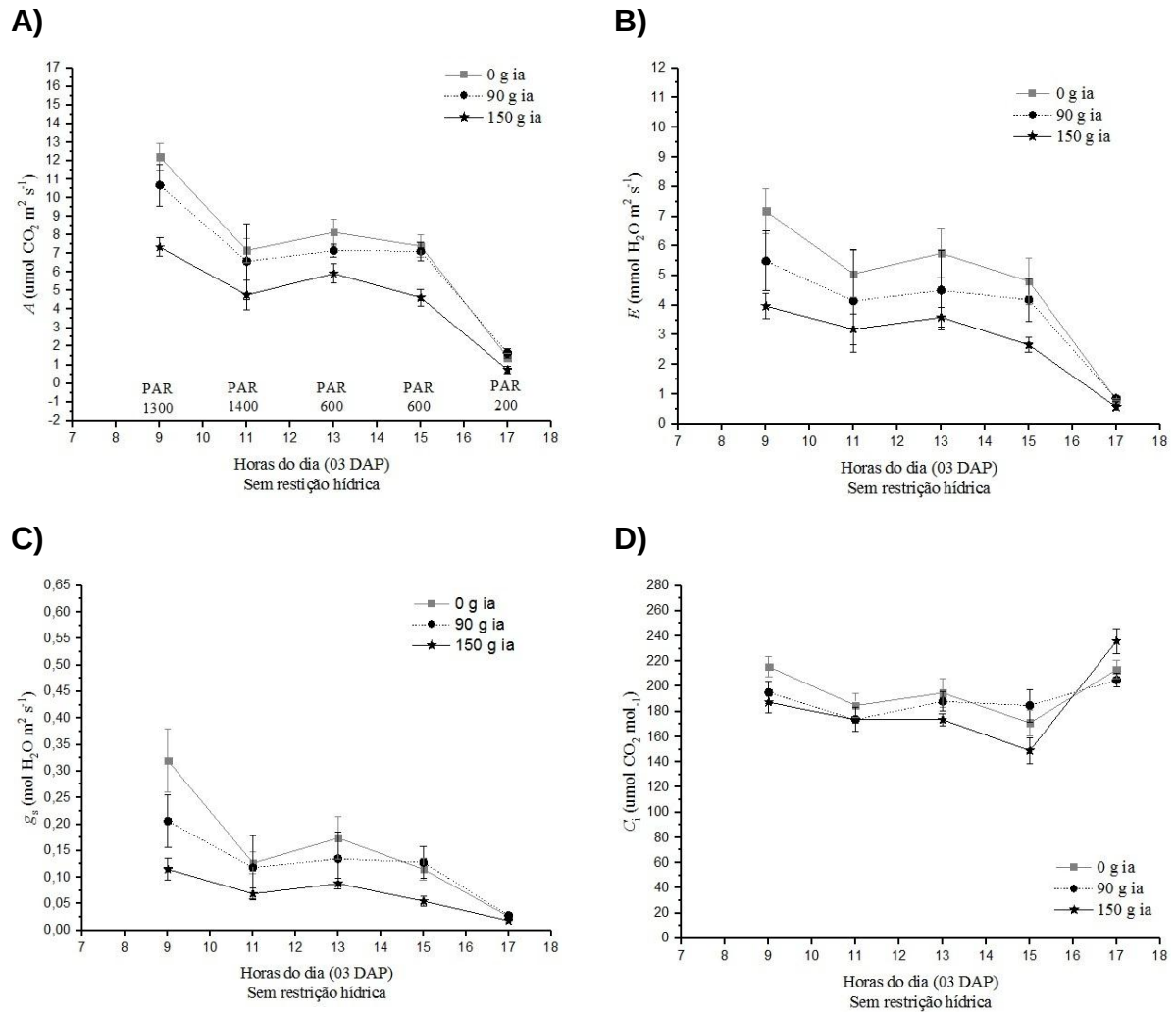


Figura 14. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sem restrição hídrica, aos 03 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

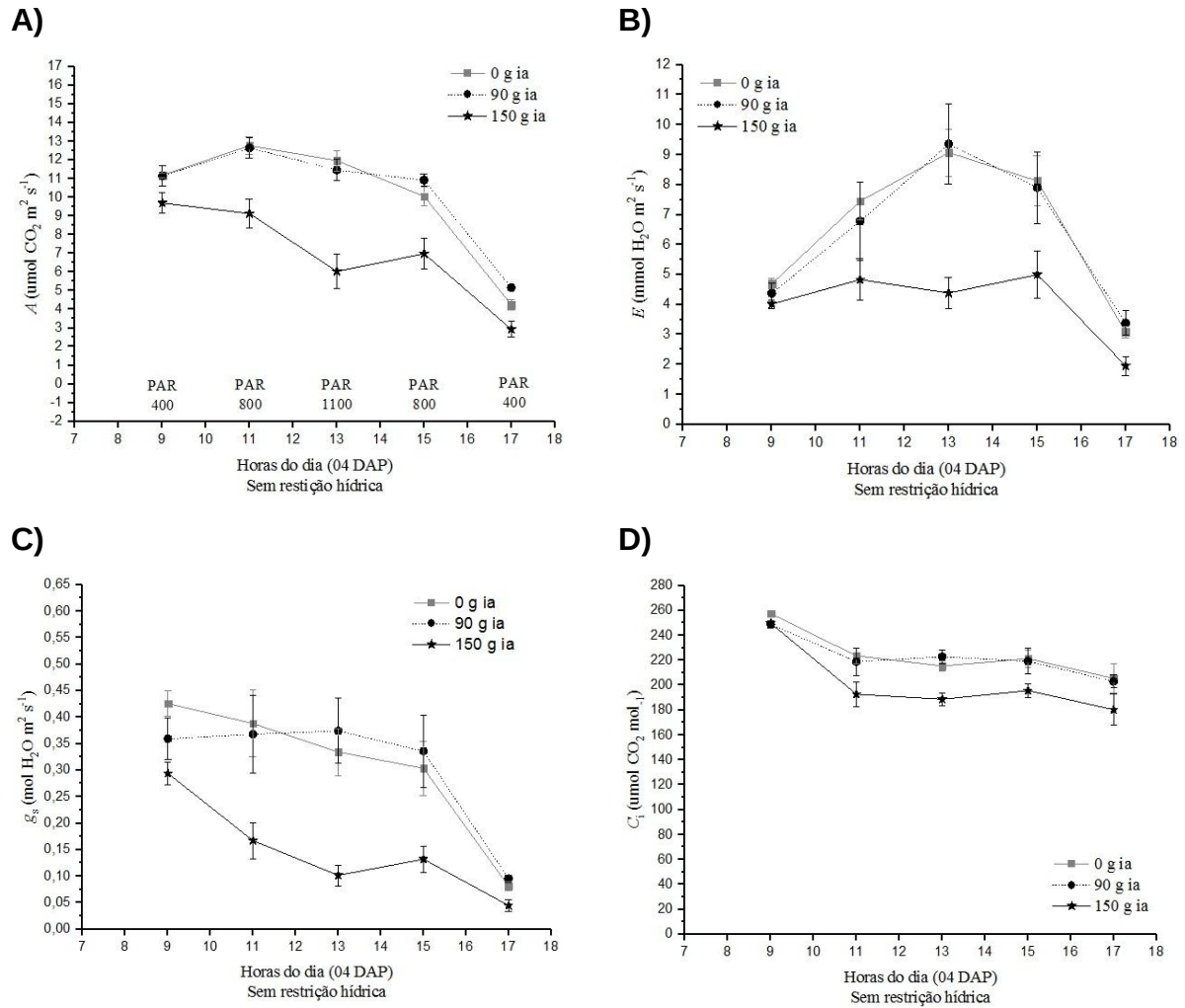


Figura 15. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sem restrição hídrica, aos 04 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

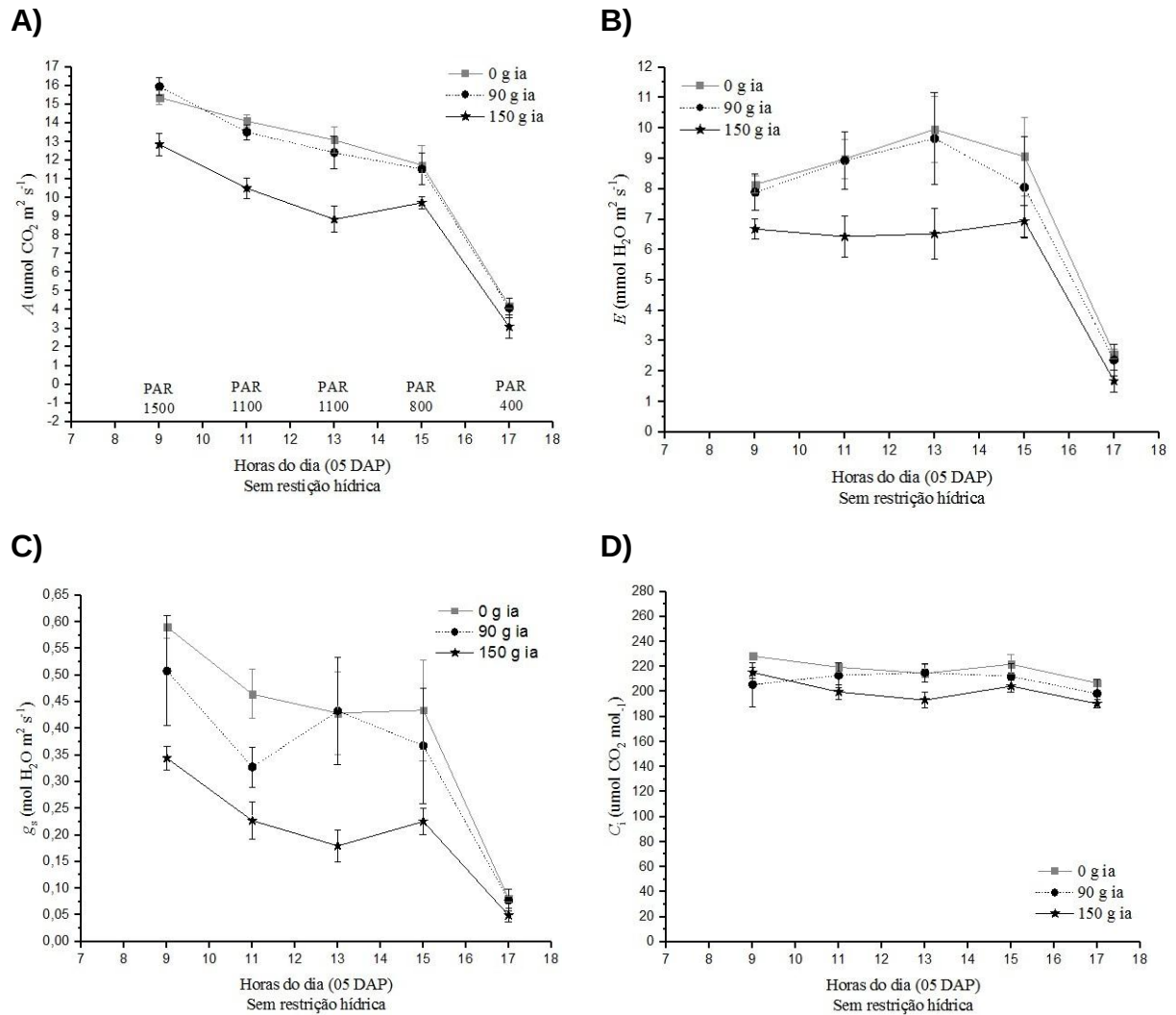


Figura 16. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sem restrição hídrica, aos 05 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

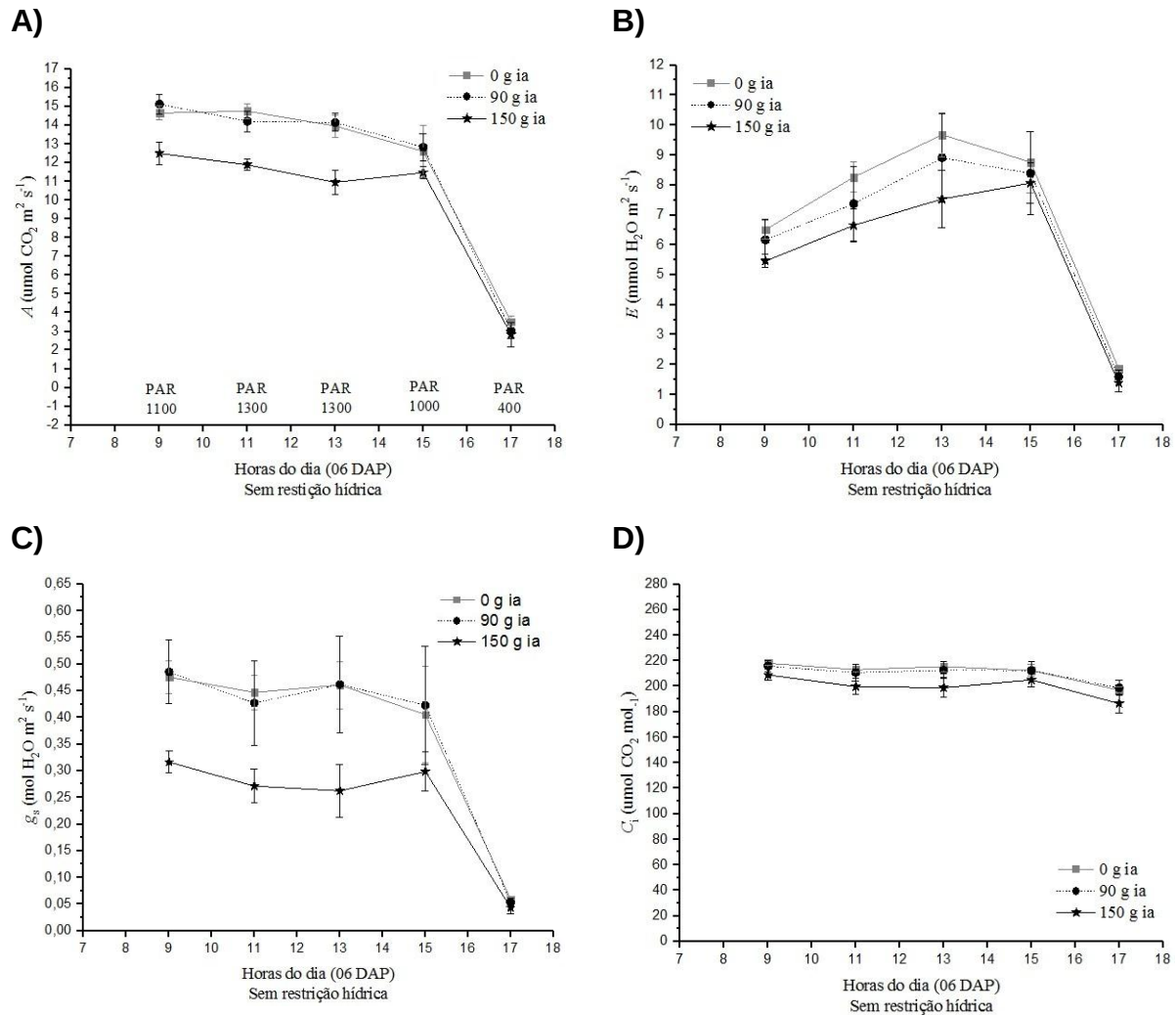


Figura 17. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sem restrição hídrica, aos 06 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Com relação às plantas cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), de maneira geral, não houve diferença entre as doses estudadas para as variáveis de A , E , g_s e C_i (Figuras 18 a 22), dos 02 aos 06 DAA, com exceção às avaliações descritas a seguir: para concentração de carbono interno, a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ apresentou menores valores que as demais aos 02 DAP (Figura 18-D); já aos 06 DAP, as plantas pulverizadas com etil-trinexapac obtiveram maior taxa de assimilação líquida de CO₂ em relação à testemunha (Figura 18-A), e a menor dose

proporcionou maior taxa de transpiração que as demais nesta mesma data (Figura 22-B).

Considerando as horas do dia, a variação nas respostas de trocas gasosas foram menos pronunciadas, em comparação às plantas cultivadas em capacidade de campo, provavelmente pelo fato de a água atuar como fator limitante para este processo. De maneira geral, foi observada maior atividade de assimilação líquida de carbono nas primeiras horas do dia (Figuras 18 a 22).

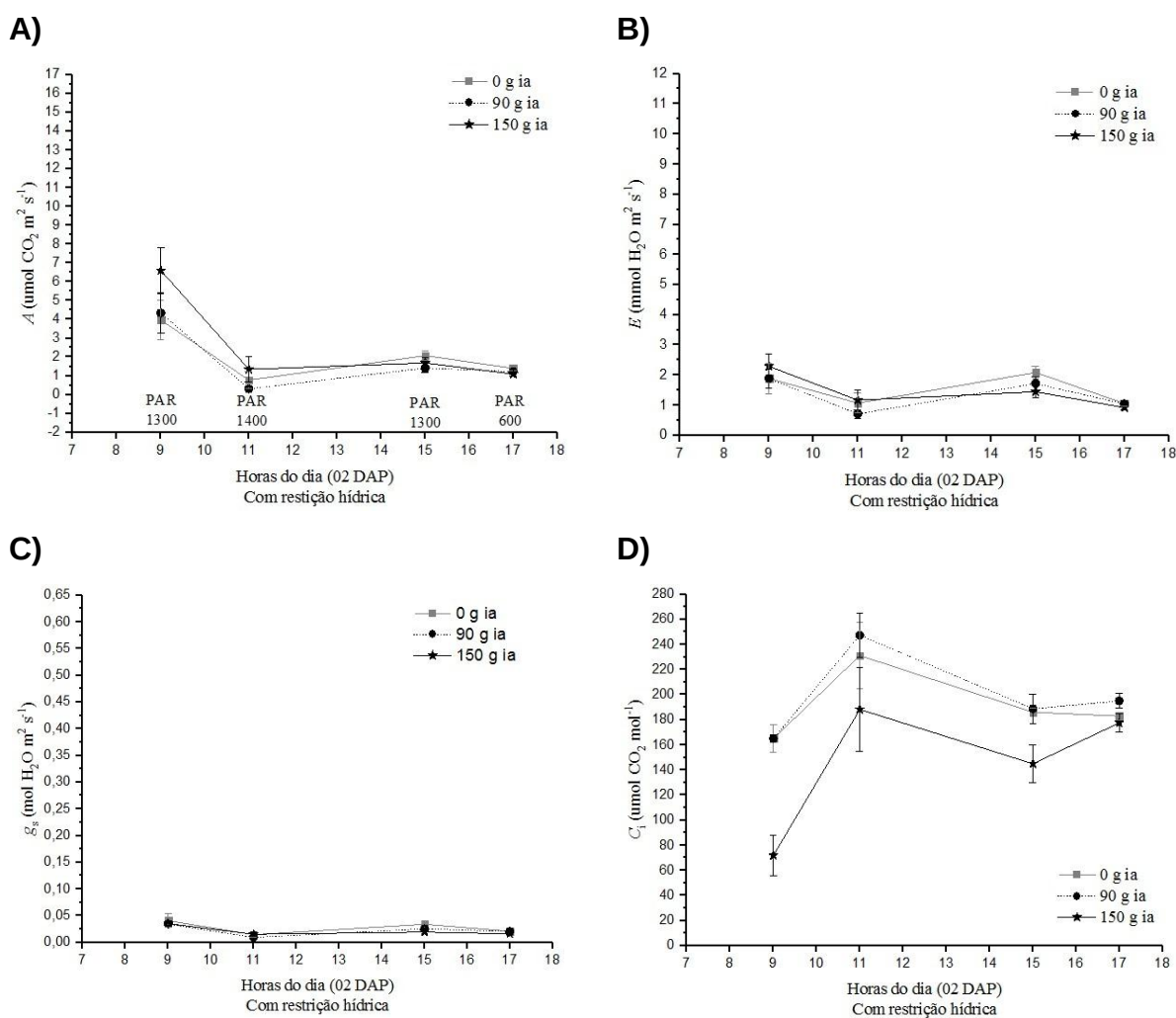


Figura 18. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), aos 02 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

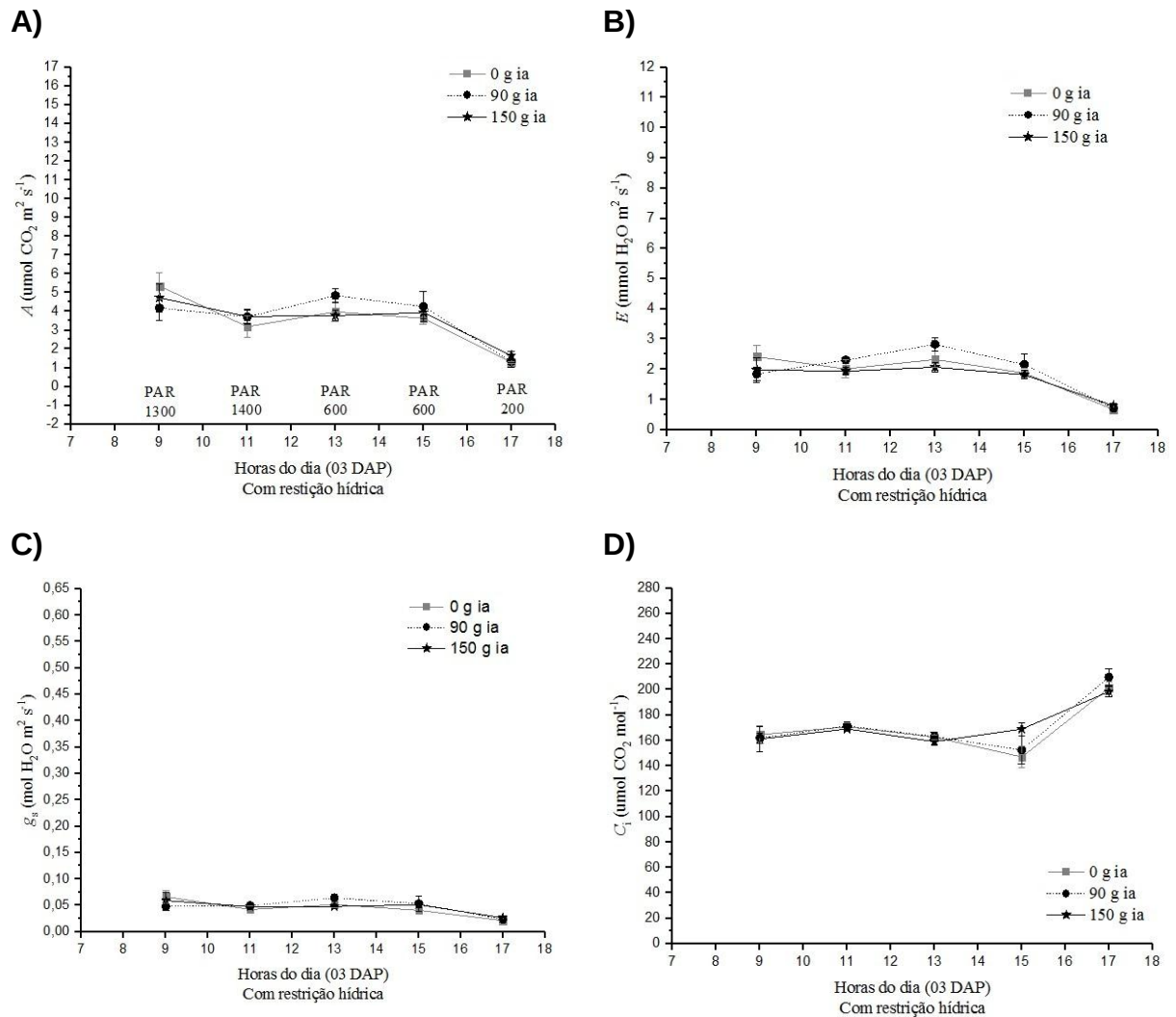


Figura 19. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), aos 03 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

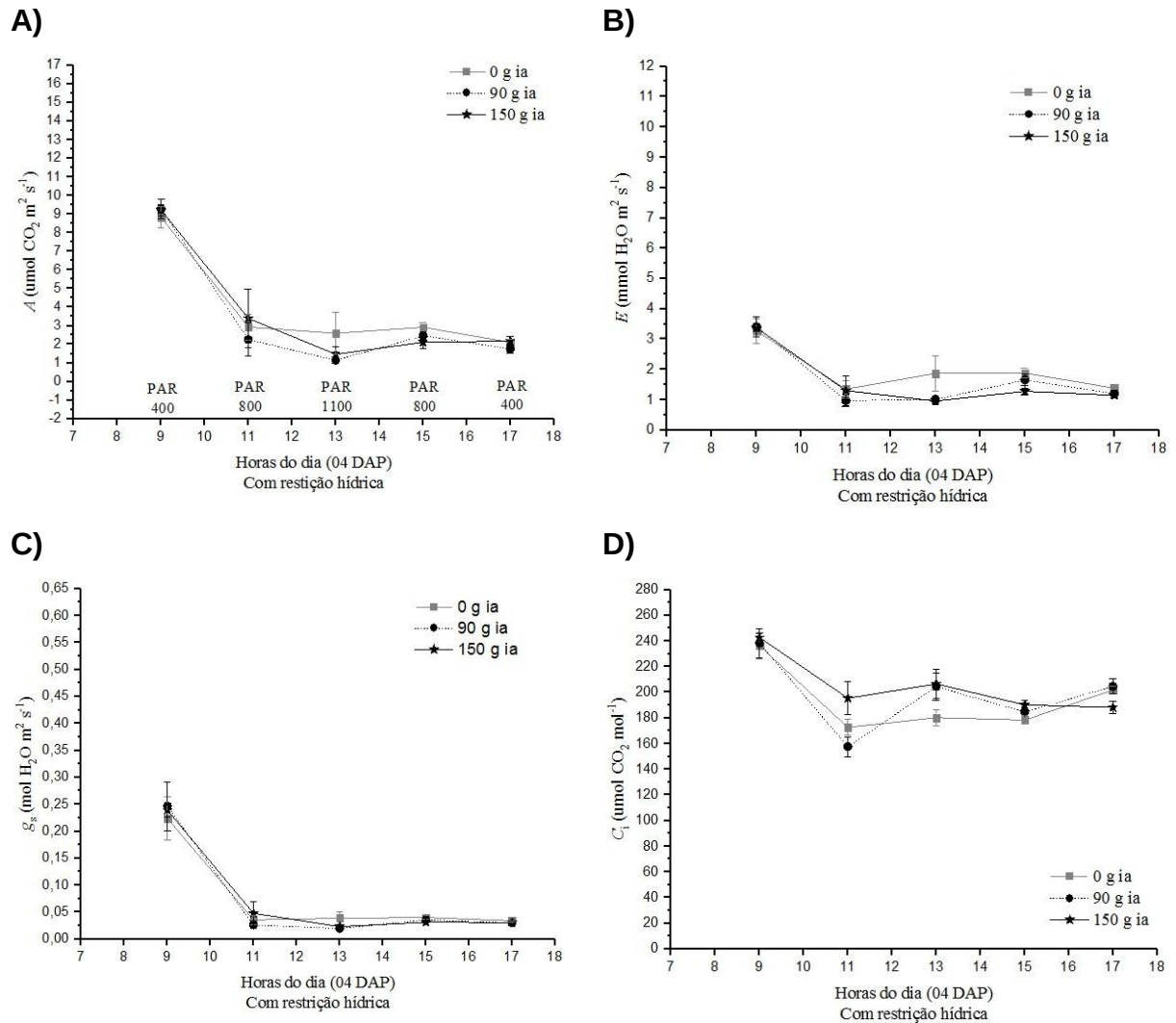


Figura 20. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), aos 04 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

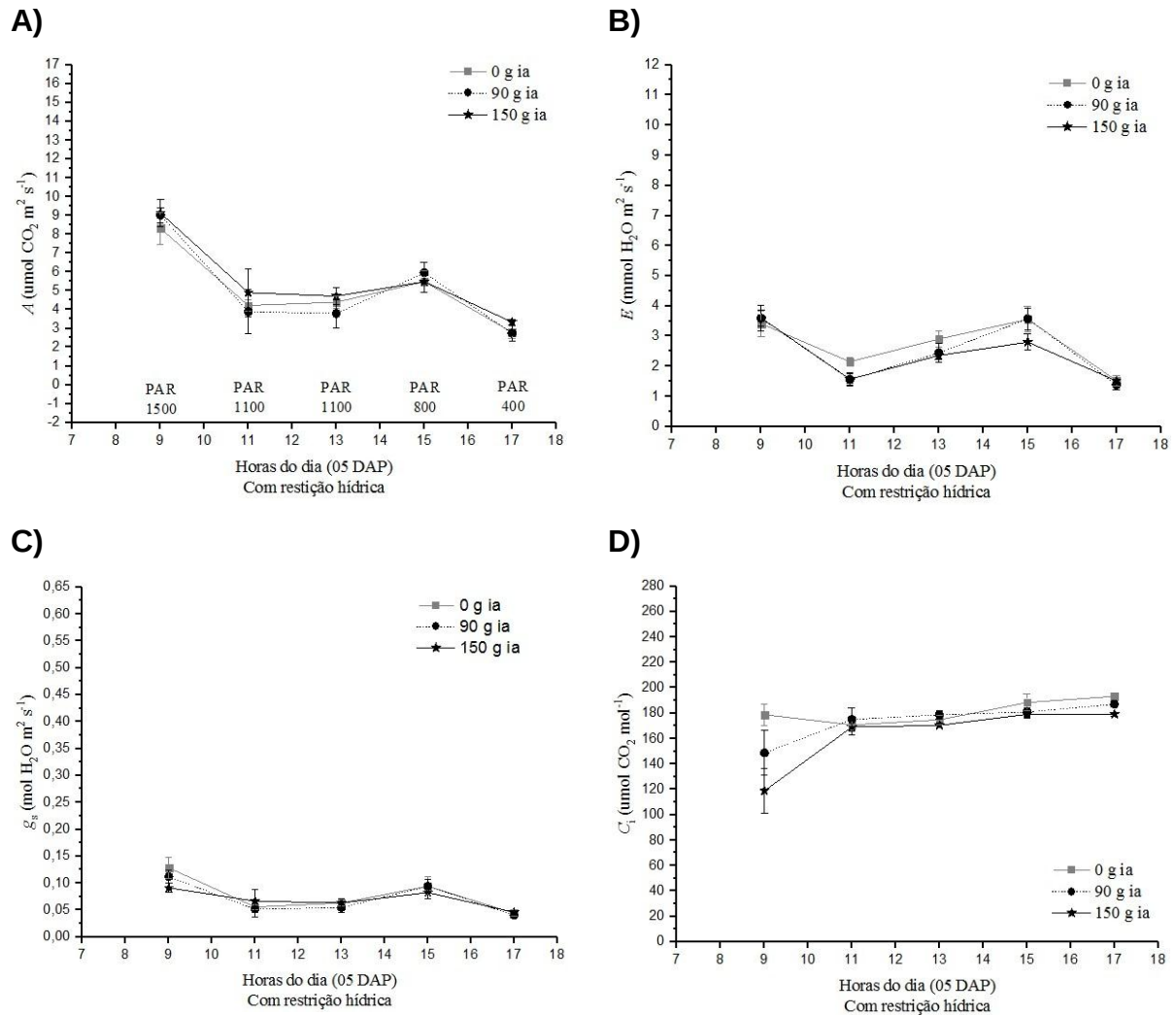


Figura 21. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), aos 05 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

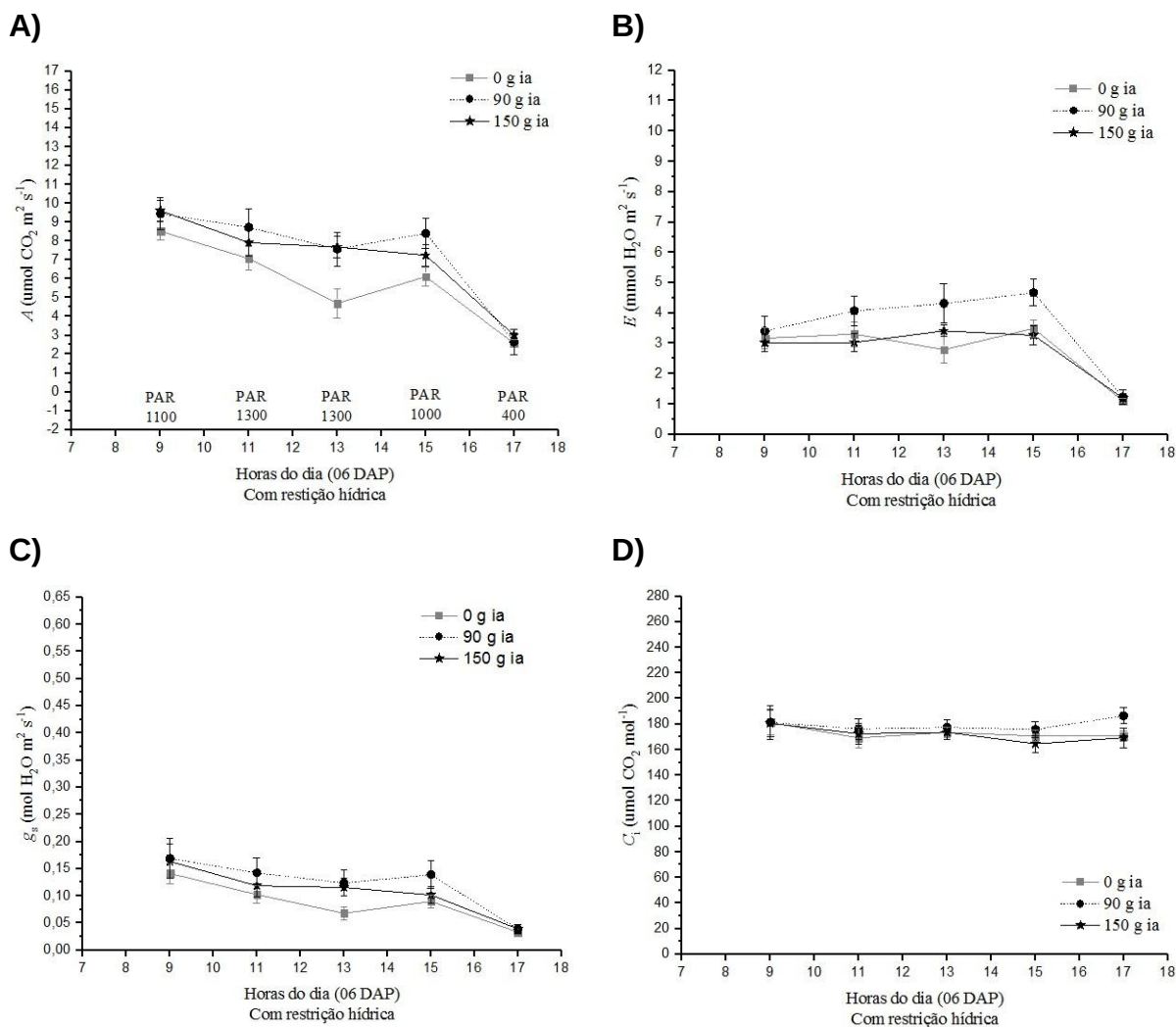


Figura 22. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo), aos 06 dias após a aplicação de etil-trinexapac. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Quando comparadas as condições hídricas estudadas, considerando a média das doses de etil-trinexapac, houve uma maior atividade de trocas gasosas nas plantas cultivadas em capacidade de campo (Figuras 23 a 27), sendo as menores diferenças constantemente observadas para a variável de concentração de carbono interno (Figuras 23-D à 27-D).

Em relação às horas do dia, aos 04, 05 e 06 DAP, as maiores diferenças entre as condições hídricas foram observadas nas avaliações realizadas entre as 11 e as 15 horas, uma vez que nas primeiras horas da manhã as plantas sob restrição de água obtiveram melhor desempenho que os demais horários, com maiores valores de taxa de assimilação líquida de CO_2 (Figuras 25 a 27). Já às 17 horas, na maior parte das vezes, os valores anotados para ambas condições hídricas foram semelhantes, devido à redução no metabolismo fotossintético das plantas em decorrência da diminuição da radiação fotossinteticamente ativa (Figuras 23 a 27).

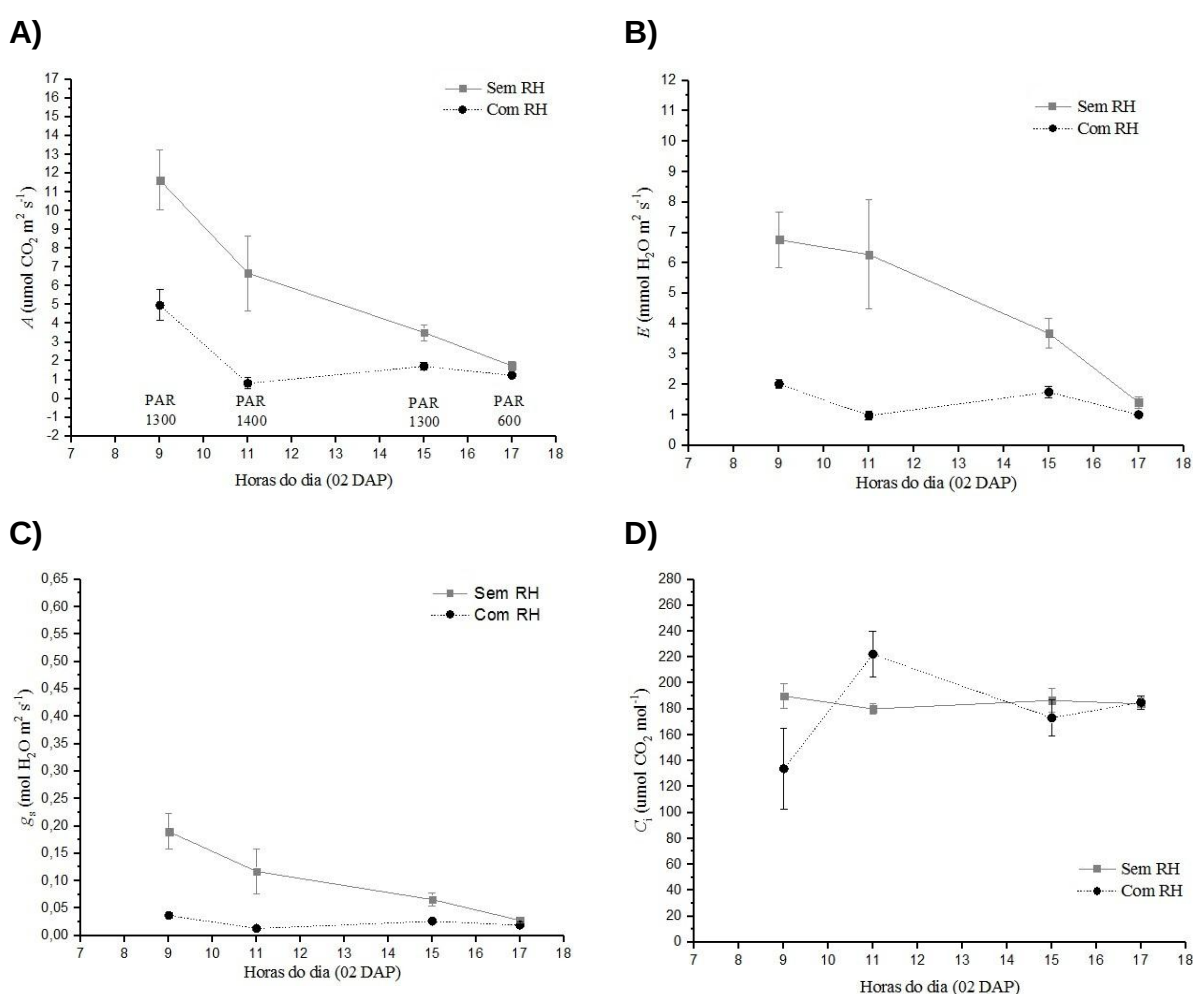


Figura 23. Assimilação líquida de CO_2 (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO_2 interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) cultivadas com e sem restrição hídrica, aos 02 dias após a aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

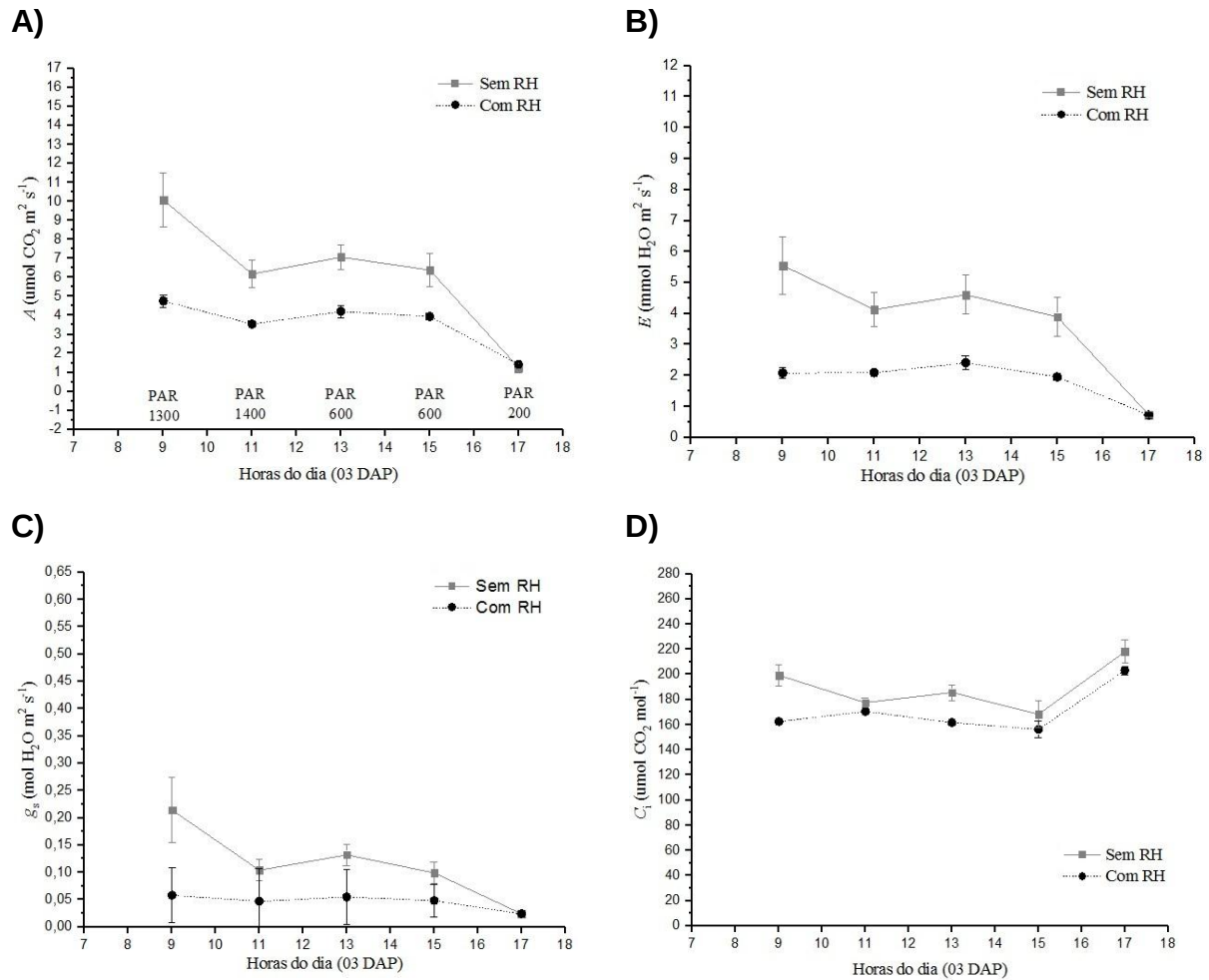


Figura 24. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) cultivadas com e sem restrição hídrica, aos 03 dias após a aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

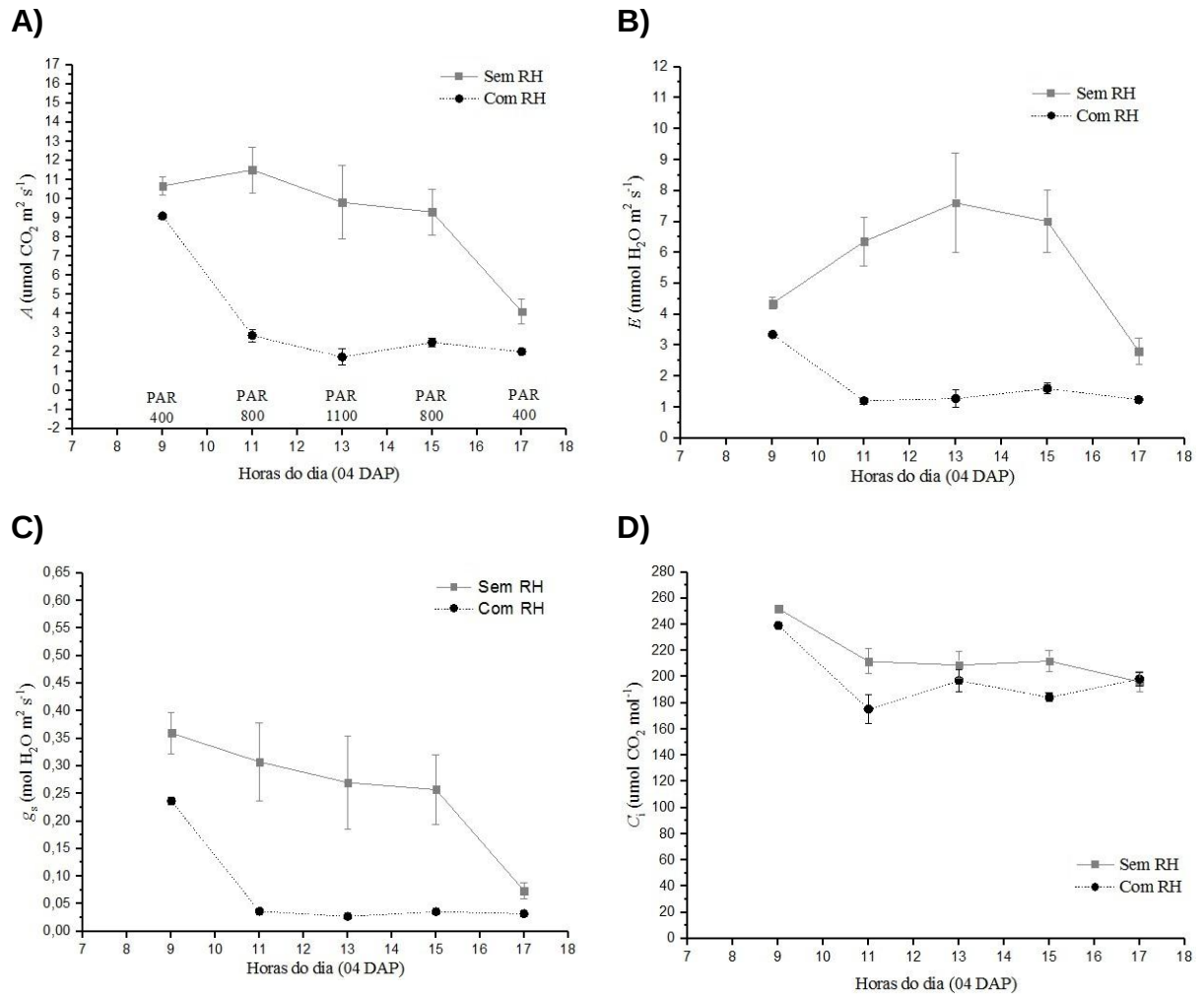


Figura 25. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) cultivadas com e sem restrição hídrica, aos 04 dias após a aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

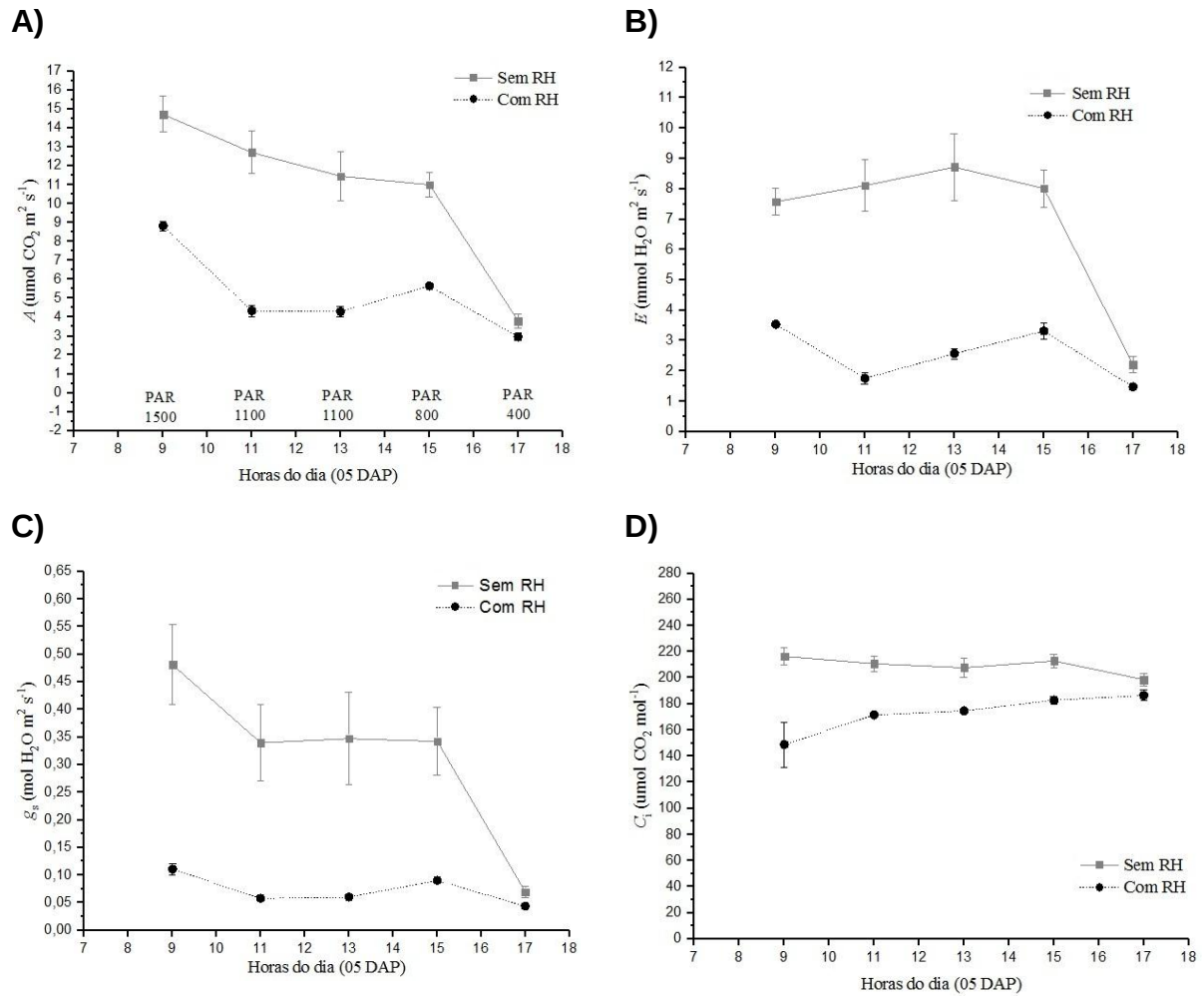


Figura 26. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) cultivadas com e sem restrição hídrica, aos 05 dias após a aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

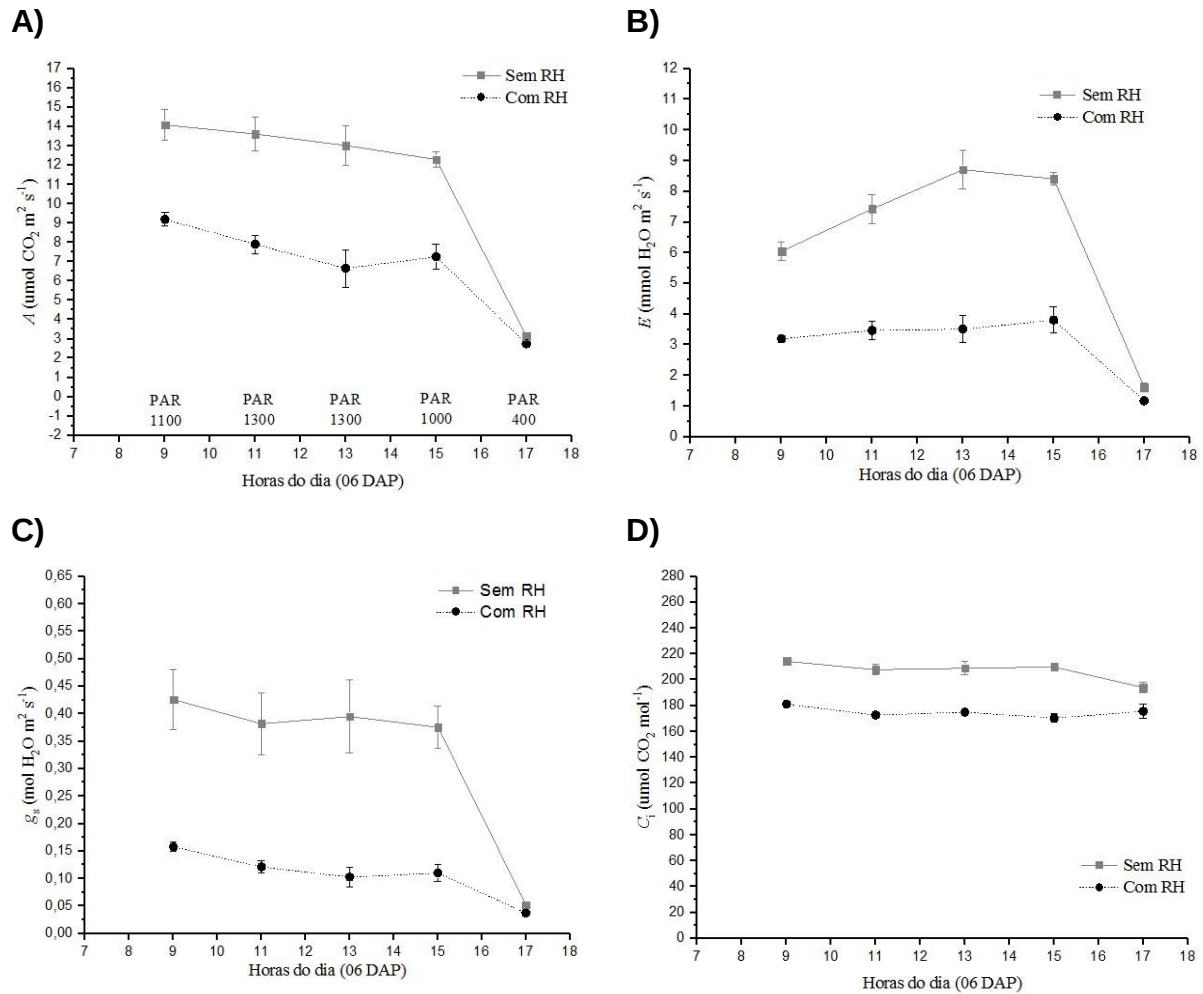


Figura 27. Assimilação líquida de CO₂ (A), taxa de transpiração (B), condutância estomática (C) e concentração de CO₂ interno de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) cultivadas com e sem restrição hídrica, aos 06 dias após a aplicação de etil-trinexapac. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Eficiência Quântica do Fotossistema II

No que tange à eficiência quântica do fotossistema II das plantas de eucalipto conduzidas sem restrição hídrica, não foi observada diferença constante entre as doses de etil-trinexapac aplicadas (Figura 28). Isoladamente, nas avaliações realizadas às 15 horas aos 02 e 04 DAP, houve diferença entre os tratamentos, em que a maior dose diferiu das demais no primeiro dia de medição (Figura 28-A), com a testemunha igualando-se à ela aos 04 DAP (Figura 28-C). Além disso, houve

pouca variação de F_v/F_m ao decorrer dos dias, sempre com valores entre 0,75 à 0,85 (Figura 28).

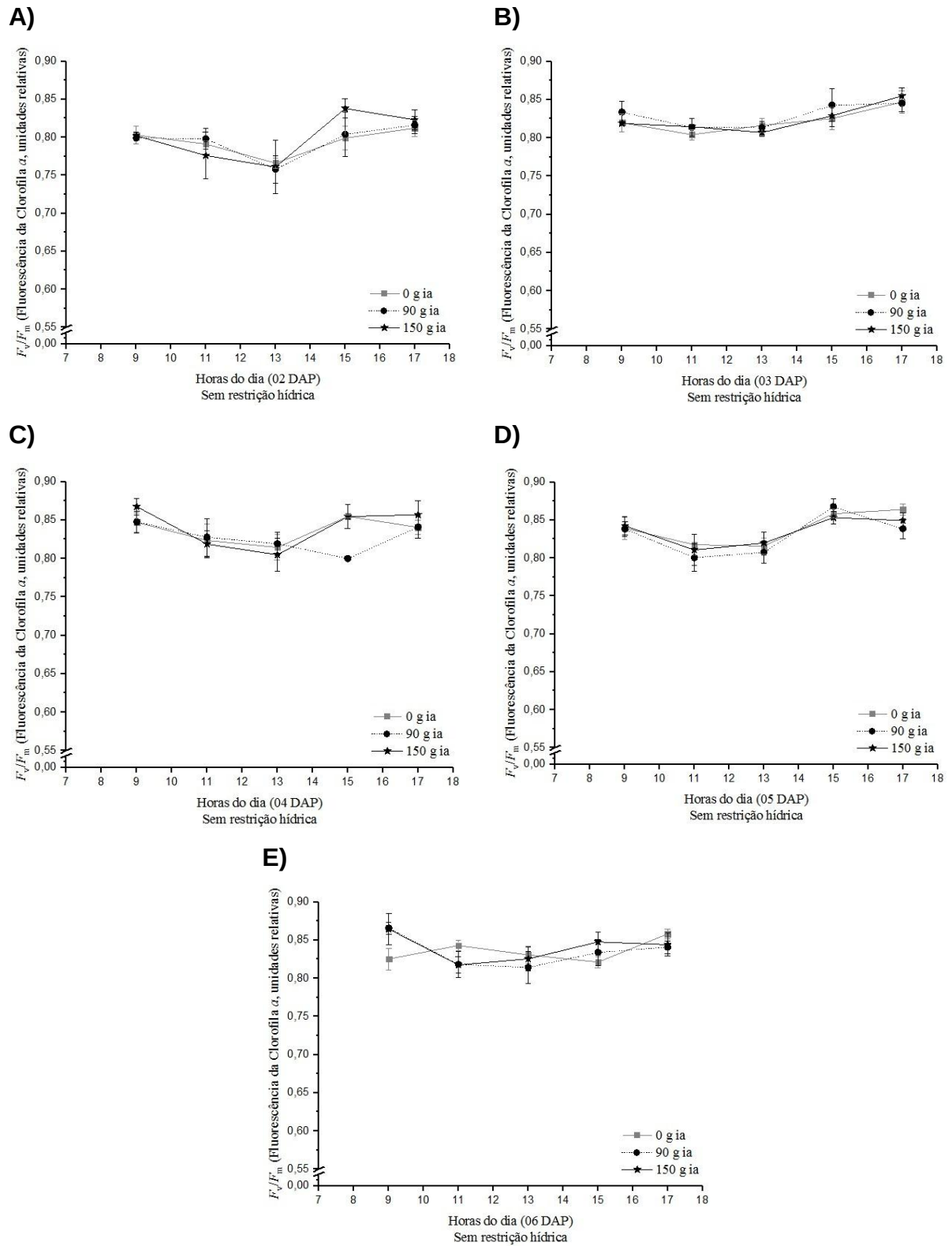


Figura 28. Eficiência quântica do Fotossistema II de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), aos 02 (A), 03 (B), 04 (C), 05 (D) e 06 (E) dias após a aplicação de etil-trinexapac, e cultivadas sem restrição hídrica. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Para as plantas de eucalipto conduzidas sob restrição hídrica, novamente os valores de eficiência quântica do fotossistema II não apresentaram diferenças constantes em relação às doses de etil-trinexapac (Figura 29). Especificamente aos 04 e 05 DAP, na medição conduzida às 13 horas, as plantas tratadas com 150 g i.a. ha⁻¹ apresentaram maiores valores para essa característica em relação às demais (Figuras 29-C e 29-D). Assim como observado para os eucaliptos conduzidos em capacidade de campo, houve pouca variação nos valores durante as horas do dia, anotando sempre valores entre 0,75 e 0,85, os quais são considerados adequados para plantas com aparatos fotossintéticos saudáveis (Figura 29).

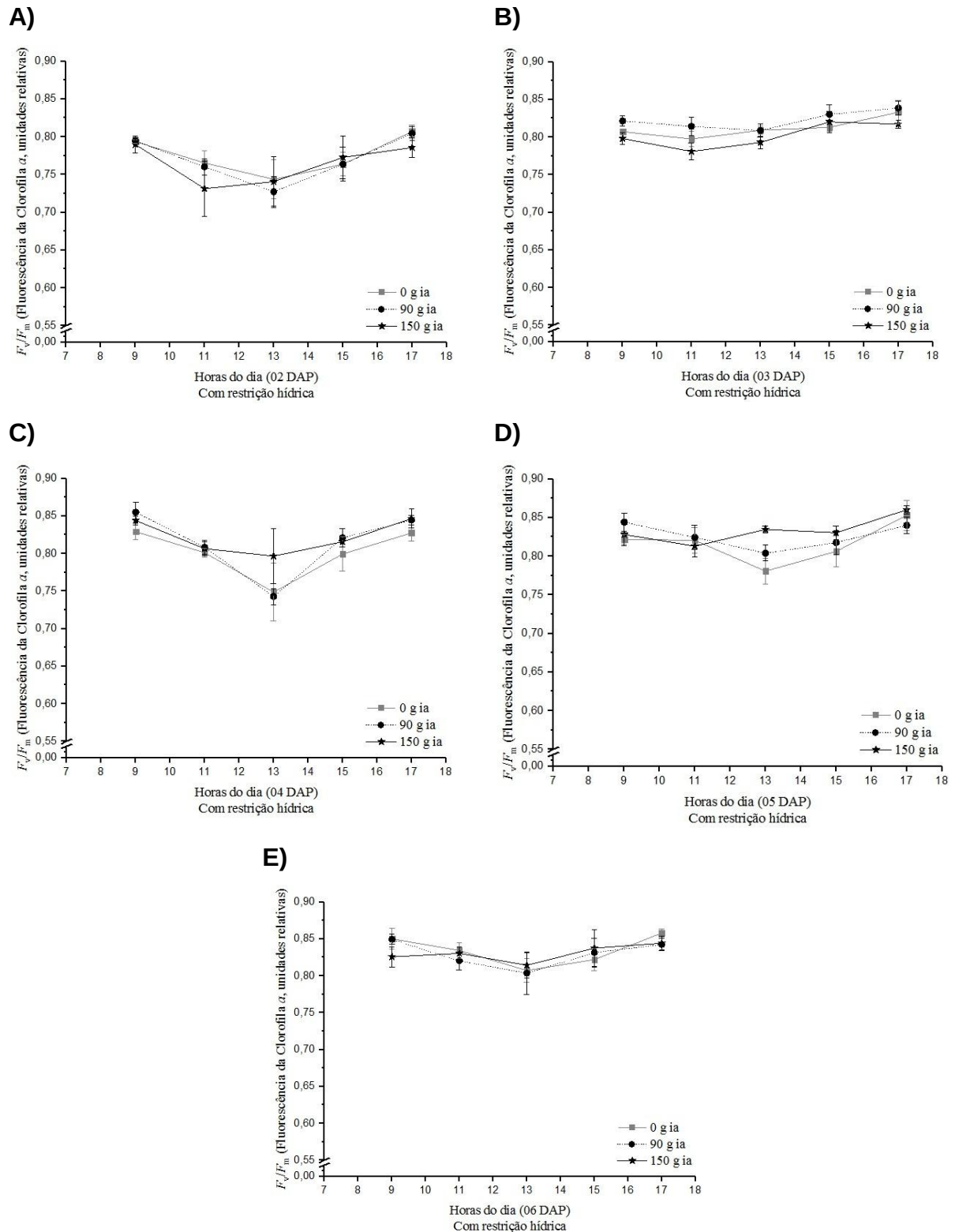


Figura 29. Eficiência quântica do Fotossistema II de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), aos 02 (A), 03 (B), 04 (C), 05 (D) e 06 (E) dias após a aplicação de etil-trinexapac, e cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo). As doses correspondem a 0, 90 e 150

g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Comparando as condições hídricas considerando a média das doses de etil-trinexapac, foi observada maior eficiência quântica do fotossistema II para as plantas conduzidas na ausência de restrição hídrica (Figura 30), assim como no primeiro experimento. Apesar disso, todos os valores estão dentro da faixa considerada adequada para plantas de eucalipto (entre 0,75 e 0,85).

Já para o comportamento ao longo do dia, com exceção à avaliação realizada aos 03 DAP (Figura 30-B), foi observado uma tendência de redução dos valores de F_v/F_m até às 13 horas, com recuperação gradual nas horas subsequentes, até atingirem os valores iniciais (Figura 30).

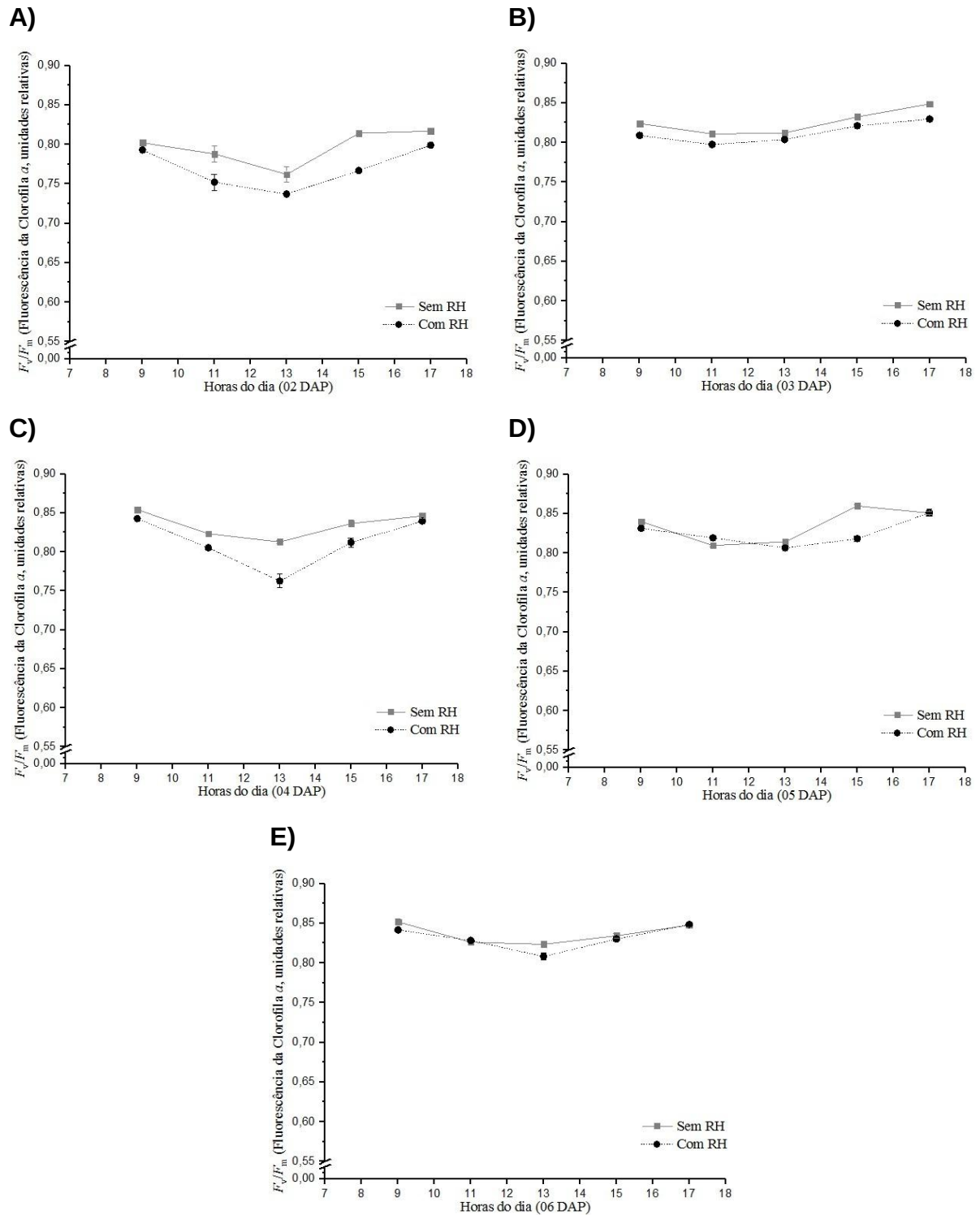


Figura 30. Eficiência quântica do Fotossistema II de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407), aos 02 (A), 03 (B), 04 (C), 05 (D) e 06 (E) dias após a aplicação de etil-trinexapac (Moddus®), cultivadas com e sem restrição hídrica. Os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas em ambas condições hídricas. DAP = dias após o plantio do eucalipto. Jaboticabal-SP, 2021.

Teor Relativo de Clorofila Total

Em relação ao teor de clorofila total das plantas de eucalipto conduzidas sem restrição hídrica, observou-se que aos 05 e 06 DAP as testemunhas apresentaram maiores valores para essa característica, em relação às demais doses (Figura 31-A). Já sob restrição hídrica, o efeito foi o oposto, apresentando, de maneira constante, menores quantidades de clorofila que os demais tratamentos (Figura 31-B).

Quando as condições hídricas foram comparadas, foi possível notar um maior nível de clorofilas a partir dos 03 DAP para as plantas cultivadas em capacidade de campo (Figura 31-C), no entanto, assim como observado no primeiro experimento (Figura 8), é possível que mais tardiamente a resposta fosse o oposto (por volta dos 20 DAP), devido ao maior crescimento das plantas sem restrição hídrica.

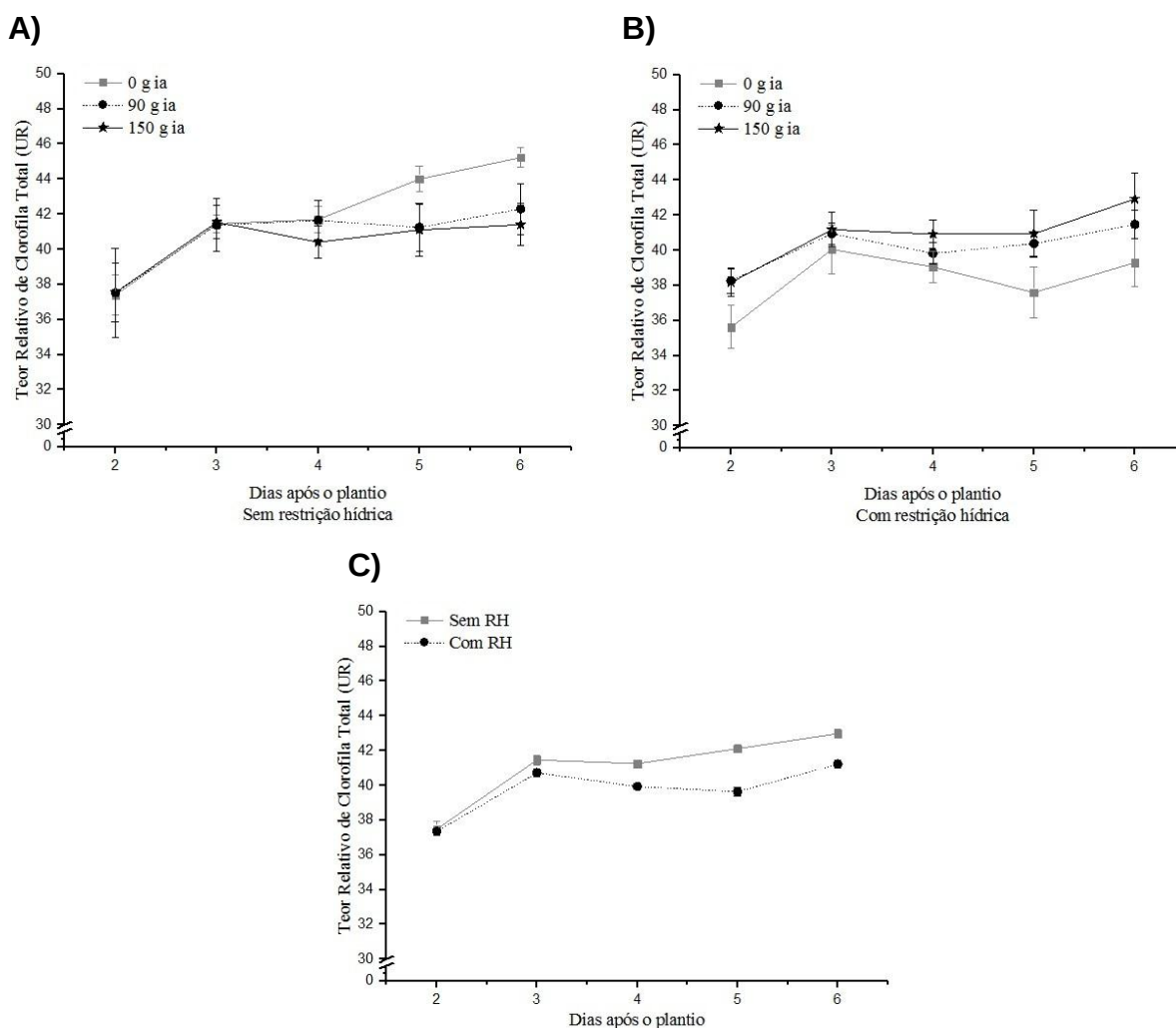


Figura 31. Teor relativo de clorofila total de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sem (A) e com (B) restrição hídrica. Comparação entre as condições hídricas (C), em que os valores indicados foram obtidos a partir das médias das doses utilizadas. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). Jaboticabal-SP, 2021.

Crescimento

Em relação ao crescimento do eucalipto sem restrição hídrica, notou-se que logo aos 16 DAP, as plantas tratadas com 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac obtiveram valores de altura significativamente maiores que os demais tratamentos, mantendo a diferença até o final do período experimental (Figura 32-A). De outra maneira, para o diâmetro das plantas, não foi observada diferença entre os tratamentos ($p>0,05$), no entanto, vale ressaltar que a aplicação do produto fez com que os eucaliptos tendessem a obter maiores valores de diâmetro, principalmente antes da realização da adubação (ocorrida a partir de 62 DAP) (Figura 32-B).

Para as variáveis de massa seca e área foliar, já aos 14 DAP foi possível observar diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos, em que o aumento da dose de etil-trinexapac favoreceu de maneira direta o crescimento das plantas (Figuras 32-C, D, E e F). A diferença entre os tratamentos teve um aumento progressivo até a avaliação realizada aos 42 DAP, quando a área foliar e a massa seca do caule das plantas pulverizadas com 150 g i.a. h⁻¹ foram, respectivamente, 47% e 63,2% maiores que a testemunha (Figuras 32-C e E). Após esse período, não mais foi observado diferença entre os tratamentos ($p>0,05$), apesar dos maiores valores obtidos pelo tratamento anteriormente descrito se manterem (Figuras 32-C, D, E e F).

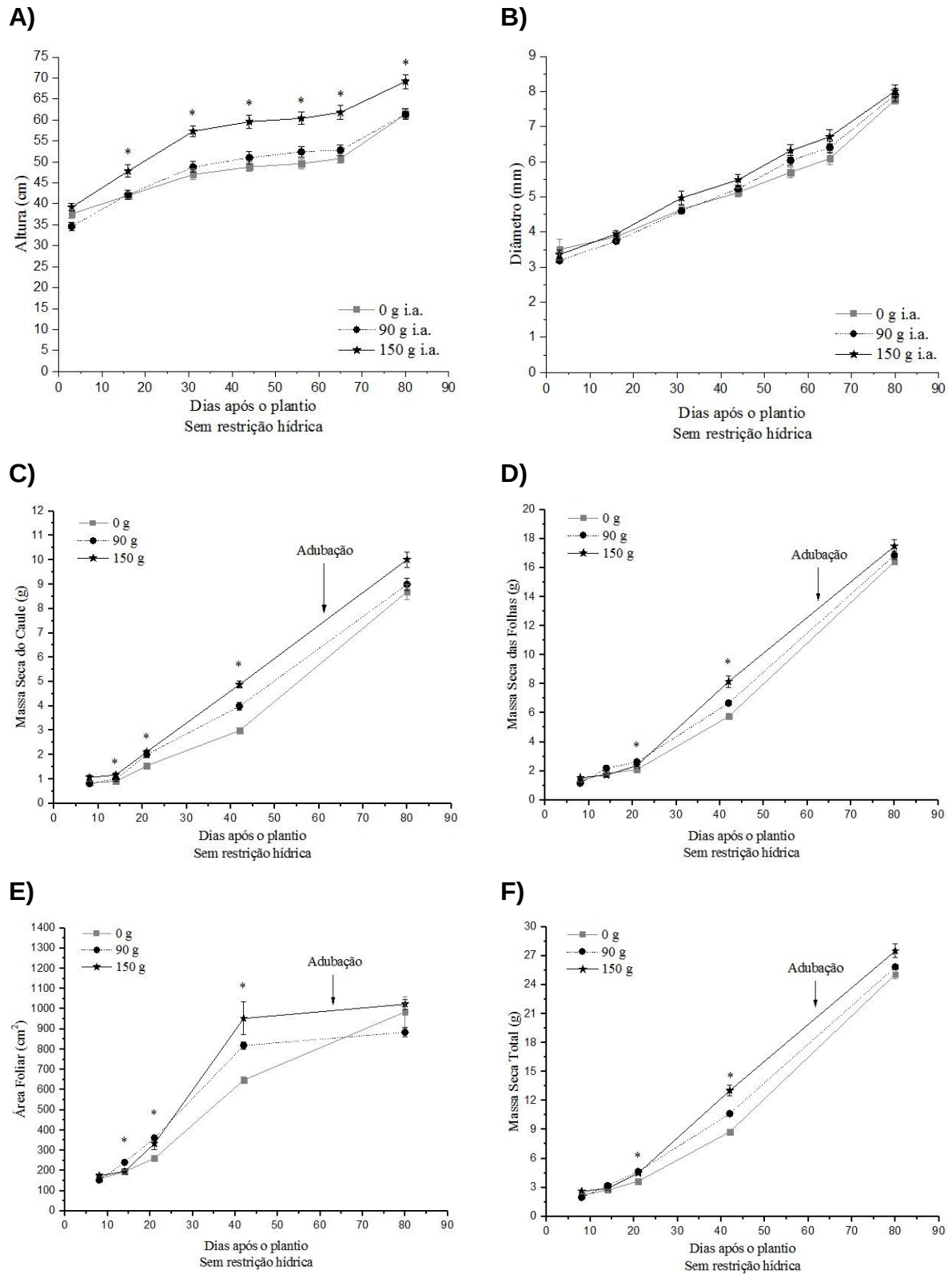


Figura 32. Altura (A), diâmetro (B), massas secas do caule (C) e folhas (D), área foliar (E) e massa seca total (F) de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sem

restrição hídrica. As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus[®]). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

No que tange ao crescimento das plantas de eucalipto cultivadas sob restrição hídrica, não foi observada diferença entre os tratamentos aplicados (Figura 34), com exceção à área foliar ao final do período experimental, em que a dose de 90 g i.a. ha⁻¹ proporcionou uma produção de área fotossinteticamente ativa 22% maior que a testemunha (Figura 34-E). Apesar disso, vale ressaltar, as plantas pulverizadas com 150 g i.a. ha⁻¹ do produto obtiveram maiores valores para todas as outras características mensuradas (Figuras 34-A, B, C, D, e F).

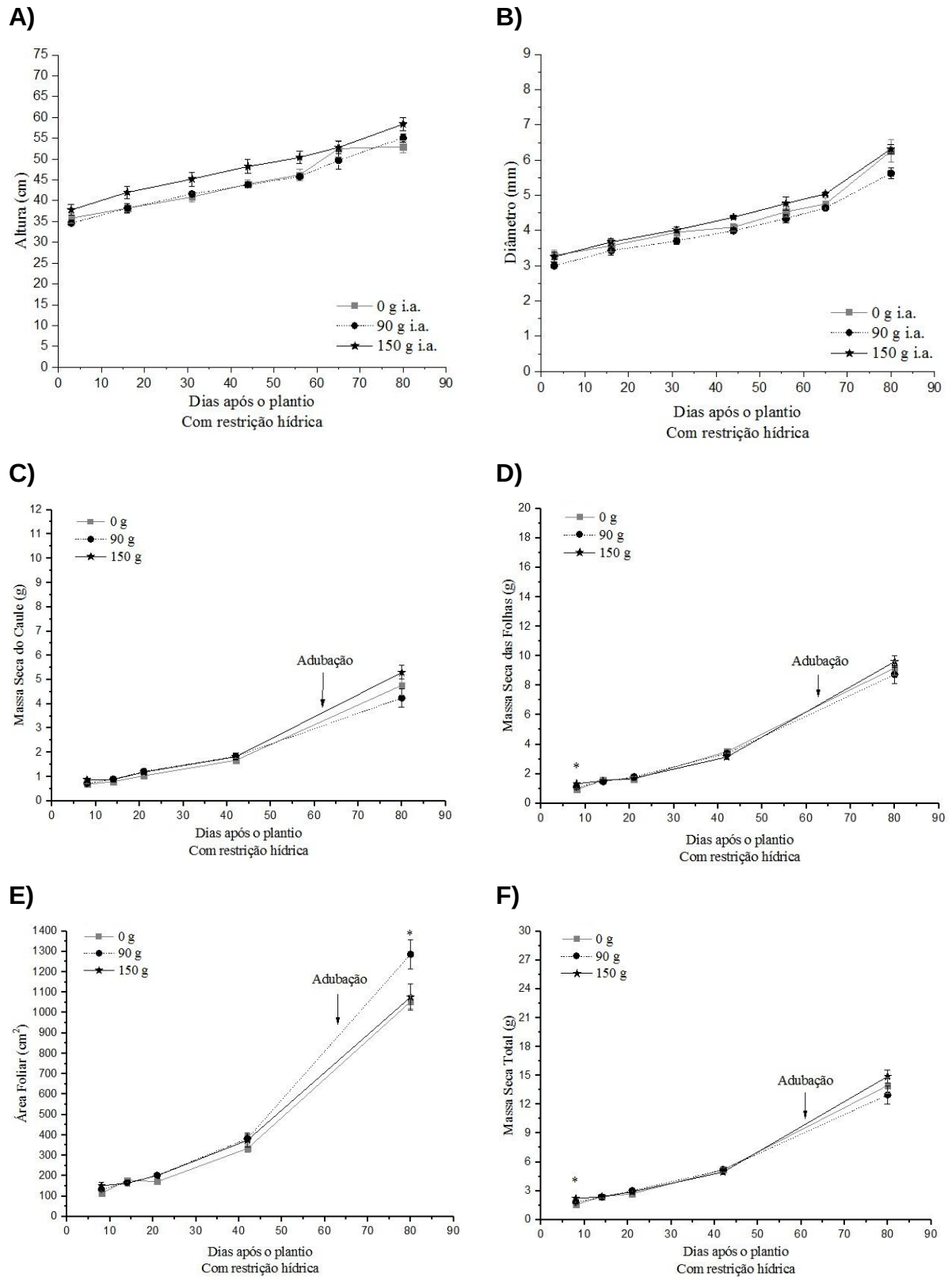


Figura 34. Altura (A), diâmetro (B), massas secas do caule (C) e folhas (D), área foliar (E) e massa seca total (F) de plantas de *Eucalyptus urograndis*

(Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas sob restrição hídrica (30% da capacidade de campo). As doses correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

Comparando as condições hídricas para o crescimento do eucalipto, foi observado que logo aos 8 DAP as plantas conduzidas em capacidade de campo começaram a apresentar diferença significativa em relação às cultivadas sob restrição (Figura 36). Ao decorrer do período experimental, a distinção entre os valores anotados para os tratamentos tendeu a aumentar, atingindo seu pico aos 81 DAP, com exceção à área foliar, que na última avaliação foi maior nos eucaliptos conduzidos sob irrigação controlada (Figura 36-E). Tal dado evidencia uma diferenciada resposta das plantas com relação à produção de folhas, em que os eucaliptos sob restrição hídrica produziram folhas mais finas, ou em menor quantidade, só que maiores que aquelas produzidas pelas plantas conduzidas em capacidade de campo (Figuras 36-D e E).

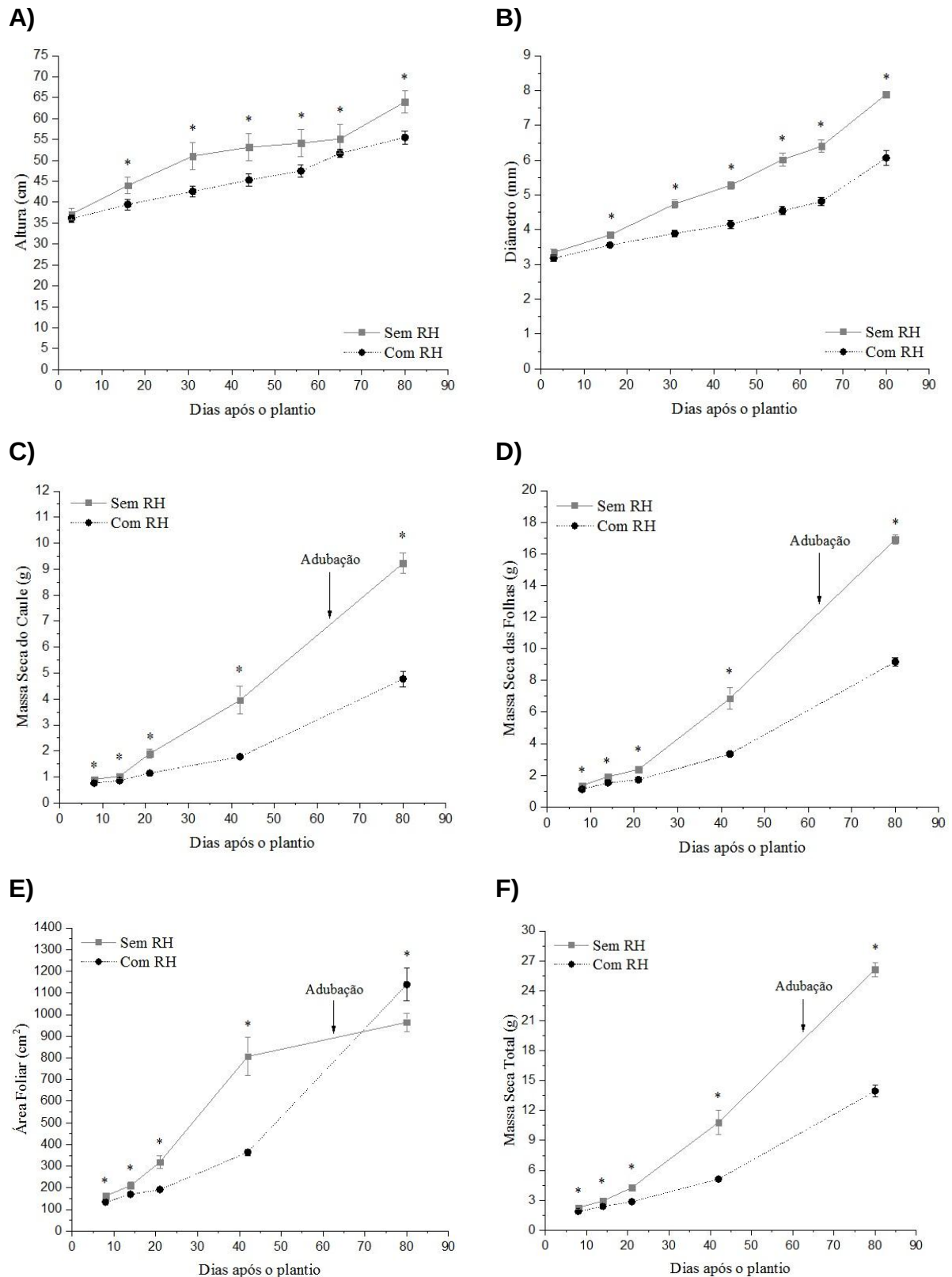


Figura 36. Altura (A), diâmetro (B), massas secas do caule (C) e folhas (D), área foliar (E) e massa seca total (F) de plantas de *Eucalyptus urograndis* (Clone 1407) submetidas à aplicação de etil-trinexapac e cultivadas com e sem restrição hídrica. Os valores indicados foram obtidos a partir das

médias das doses utilizadas, as quais correspondem a 0, 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac (Moddus®). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as condições hídricas para cada época de avaliação. Jaboticabal-SP, 2021.

4.3. Análise de compostos do metabolismo primário

Os espectros de ¹H NOESY-presat representativos dos extratos das plantas de eucalipto submetidas aos tratamentos estão expostos na Figura 38, na qual as atribuições dos sinais de aproximadamente 20 metabólitos são mostradas. É importante ressaltar que esta é uma representação geral dos metabólitos primários encontrados em todas as amostras avaliadas, havendo, ainda, outros a serem observados em análises posteriores. A confirmação dos metabólitos foi feita através das análises bidimensionais de ¹H–¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) e estão apresentados na Figura 39.

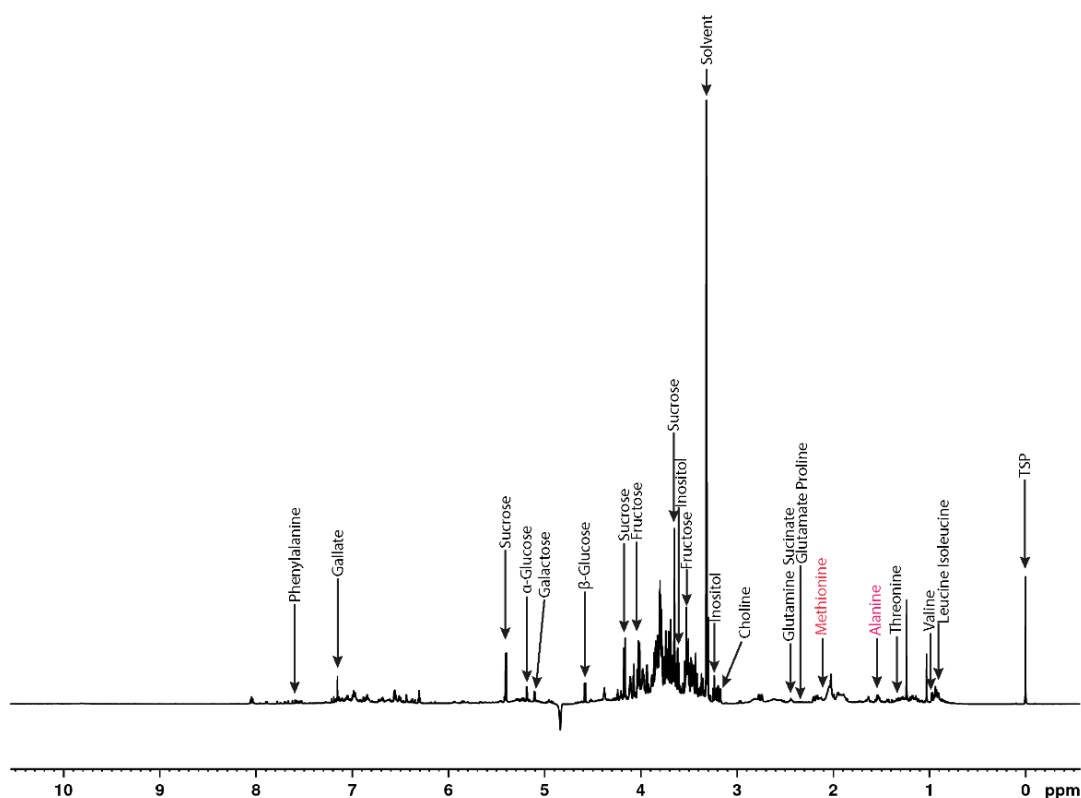


Figura 38. Lista geral dos metabólitos primários encontrados nas amostras de eucalipto processadas em ¹H-RMN. São eles, respectivamente: fenilalanina, ácido gálico, sacarose, α-glicose, galactose, β-glicose, sacarose, frutose, sacarose, inositol, frutose, inositol, colina, glutamina, glutamato, prolina, metionina, alanina, treonina, valina, leucina, isoleucina.

succinato, glutamato, prolina, metionina, alanina, treonina, valina, leucina e isoleucina.

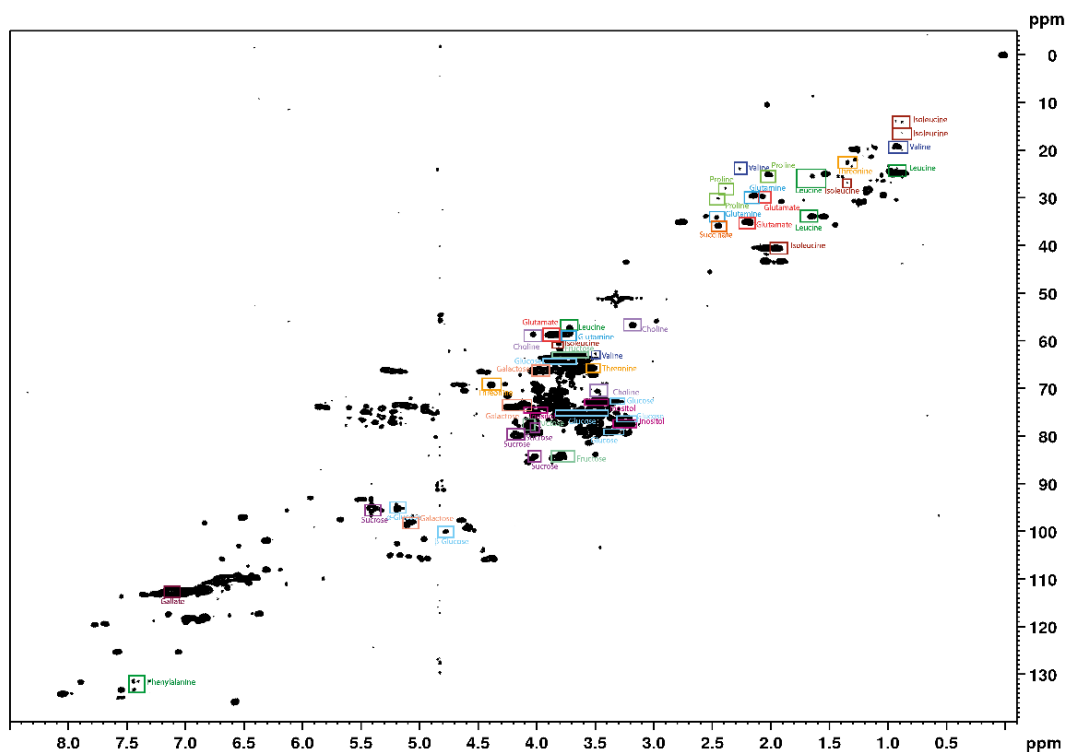


Figura 39. Lista dos metabólitos encontrados nas amostras de eucalipto processadas em ^1H - ^{13}C HSQC.

Em um primeiro momento, foi realizada uma análise de todas as amostras e tratamentos com a utilização de uma análise de componentes principais (PCA), para avaliar se as diferenças entre as amostras que receberam tratamentos distintos poderiam ser observadas. Para a análise não supervisionada, foram calculadas as diferenças entre os grupos sem conhecer previamente sua classificação.

O modelo criado (Figura 40) utilizou 14 componentes para explicar a variação do conjunto de dados. A variação de todos os componentes explicados pelo modelo (R^2X) foi de 97%. A Figura 40 mostra o gráfico de pontuação dos componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), sendo que houve uma representação de 67,8% da variância dos dados explicada pelo modelo (36,7% para o PC1 e 31,1% para PC2).

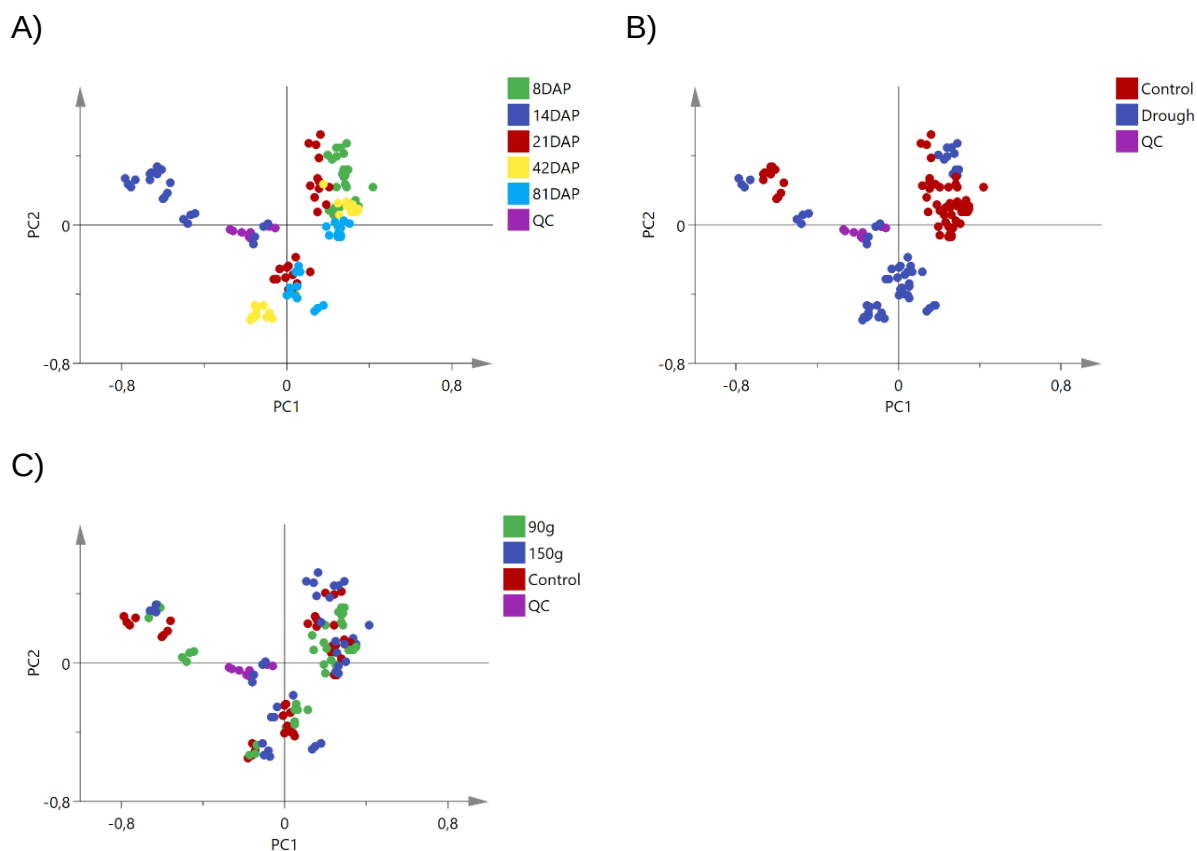


Figura 40. Análise de componentes principais (PCA) resultante do experimento de ressonância magnética nuclear (RMN) para as amostras de folhas de eucalipto coletadas aos 8, 14, 21, 42 e 81 dias após o plantio (DAP), independentemente da condição hídrica e da dose de etil-trinexapac aplicada (A); PCA comparando as condições hídricas utilizadas, independentemente da dose e da época de coleta (B); PCA comparando as doses de etil-trinexapac, independentemente das condições hídricas e época de coleta (C). QC = Controle de qualidade das amostras. 90 g e 150 g = doses de 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac, respectivamente.

De acordo com o PCA apresentado na Figura 40-B, foi possível observar que a condição de estresse hídrico apresentou maior impacto no metabolismo vegetal do que o estresse químico (i.e., aplicação de etil-trinexapac). As amostras que sofreram estresse hídrico tenderam a agrupar-se em PC2 negativo. No entanto, vale ressaltar que dois grupos de amostras não seguiram esse padrão, são eles: 8DAP e 14DAP. O primeiro grupo (pontos na coloração verde na Figura 40-A) compreende as amostras coletadas logo aos 8 dias após o plantio das mudas, o que sugere não ter

havido tempo suficiente para o metabolismo das plantas responderem ao estresse hídrico, provavelmente pelo baixo porte vegetativo das mudas e consequente baixa demanda de água no processo de transpiração. Apesar disso, é importante pontuar que nas avaliações de crescimento, a diferença entre esses tratamentos já foram observadas neste período (Figura 36). Nesse sentido, ressalta-se, ainda, que logo no plantio das mudas, as condições hídricas do solo já se encontravam nos níveis em que permaneceriam durante todo o experimento, i.e., 30% da capacidade de campo para os tratamentos mantidos em estresse hídrico e capacidade de campo para os tratamentos sem restrição de irrigação (Figura 2). O segundo grupo que não seguiu o padrão foi o de 14 DAP, dispostos em PC1 negativo e PC2 positivo (pontos na coloração azul escuro na Figura 40-A). Neste caso, todas as amostras coletadas aos 14 DAP foram agrupadas no mesmo conjunto, mostrando que nesta análise abrangente dos dados, nem o estresse ocasionado pela supressão de irrigação, e nem o tratamento químico ocasionado pelo etil-trinexapac parecem estar relacionados ao padrão encontrado nesta análise de componentes principais. Assim, pode ter havido, portanto, outro fator influenciando o deslocamento desses pontos no gráfico de PCA, os quais, acreditamos poder elucidar com a identificação final dos metabólitos encontrados nas amostras.

A avaliação do efeito das diferentes doses de etil-trinexapac, independentemente das épocas de coleta, foi realizada nas amostras que não sofreram estresse hídrico e estão mostrados na Figura 41-B. O modelo criado utilizou sete componentes para explicar a variação do conjunto de dados e a variação de todos os componentes explicados pelo modelo (R^2X) foi de 95,2%.

A Figura 41 mostra o gráfico de pontuação dos componentes principais, os quais obtiveram uma representação de 70,5% da variância dos dados explicada pelo modelo, sendo 50,0% para PC1 e 20,5% para PC2.

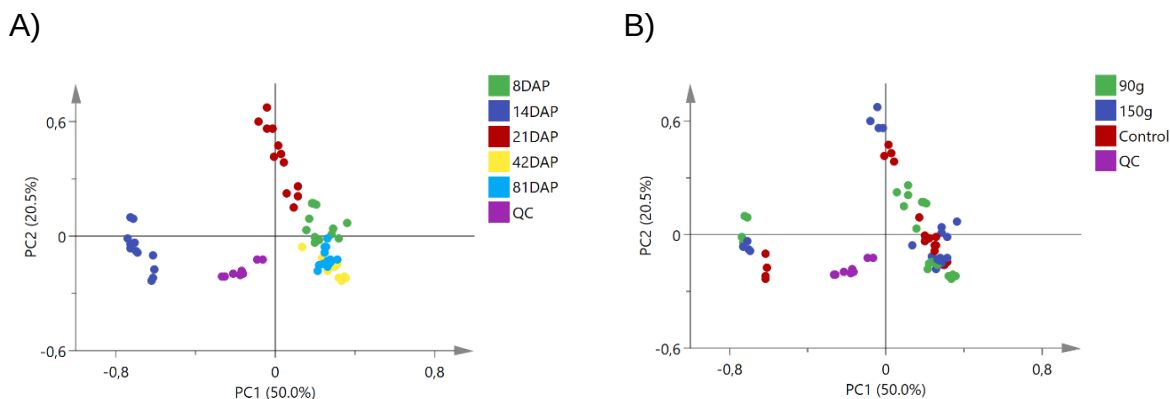


Figura 41. Análise de componentes principais (PCA) resultante do experimento de ressonância magnética nuclear (RMN) para as amostras de folhas de eucalipto coletadas aos 8, 14, 21, 42 e 81 dias após o plantio (DAP), independentemente da dose de etil-trinexapac aplicada, na condição sem restrição hídrica (A); PCA comparando as doses de etil-trinexapac, independentemente da época de coleta, na condição sem restrição hídrica (C). QC = Controle de qualidade das amostras. 90 g e 150 g = doses de 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac, respectivamente.

A avaliação do efeito do etil-trinexapac em todas as plantas coletadas aos 8, 14, 21, 42 e 81 DAP não evidenciou influência da dose do produto químico no metabolismo da planta até aqui (nessas avaliações gerais), mostrando que o dia da coleta também teve efeito no agrupamento dos dados (Figura 41-A). No entanto, é importante ressaltar que a elucidação dos compostos envolvidos nos agrupamentos (a análise de identificação e quantificação dos compostos já está sendo desenvolvida) poderão ter grande influencia na elucidação/explicação da resposta observada.

Portanto, para detectar as alterações causadas pelas diferentes doses de etil-trinexapac no metabolismo das plantas de eucalipto, foi realizada uma análise de componentes principais apenas com as amostras coletadas aos 42 DAP. O modelo criado, apresentado na Figura 42, utilizou quatro componentes para explicar a variação do conjunto de dados, a qual obteve R^2X de 87,5%. A Figura 42 mostra o gráfico de pontuação dos componentes principais, que representaram 57,4% da variância dos dados explicada pelo modelo, sendo 38,7% para o PC1 e 18,7% para o PC2.

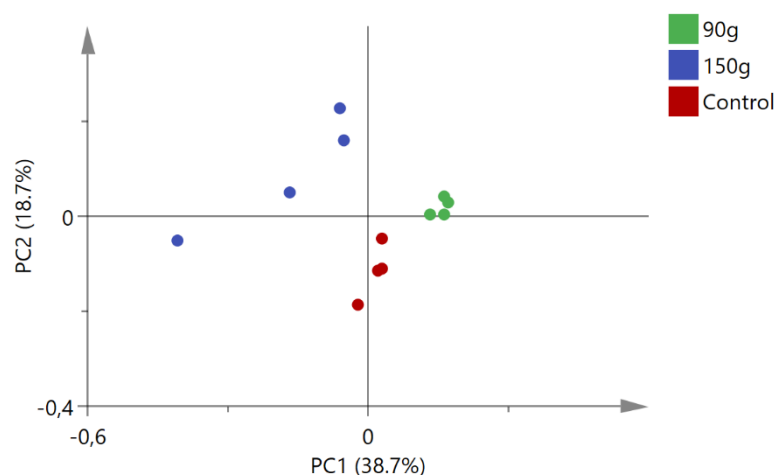


Figura 42. Análise de componentes principais (PCA) resultante do experimento de ressonância magnética nuclear (RMN) para as amostras de folhas de eucalipto coletadas aos 42 dias após o plantio (DAP), na condição sem restrição hídrica. 90 g e 150 g = doses de 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac, respectivamente.

Assim, foi possível observar que o grupo controle foi agrupado em PC2 negativo, enquanto as amostras tratadas com as doses de 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac foram agrupadas em PC2 positivo. Uma separação entre os dois grupos que receberam aplicação também foi observada, uma vez que as amostras tratadas com 90 g i.a. ha⁻¹ foram agrupadas no PC1 positivo, enquanto as tratadas com 150 g i.a. ha⁻¹ foram distribuídas ao longo do PC1 negativo (Figura 42).

Para detectar os principais metabólitos que causam a separação dos grupos devido ao estresse hídrico, os grupos 21DAP e 42 DAP foram selecionados para uma análise de PLS-DA (Figura 43). Esses dois grupos foram escolhidos porque era importante eliminar variações metabólicas influenciadas por outros fatores. Por exemplo, o grupo 8 DAP não teve tempo suficiente para apresentar uma resposta metabólica à seca (Figura 40-B). Da mesma forma, o grupo 14 DAP não foi escolhido por ter sofrido um deslocamento completo (em todas as amostras) que não pôde ser explicado por nenhum dos motivos testados (Figura 40-A).

Assim, o modelo criado (Figura 43) utilizou cinco componentes para explicar a variação do conjunto de dados, a qual obteve R²X de 93,1%. A Figura 43-A mostra o gráfico de pontuação dos componentes principais, que representaram 83,7% da variância dos dados, sendo 59,5% para PC1 e 24,2% para PC2.

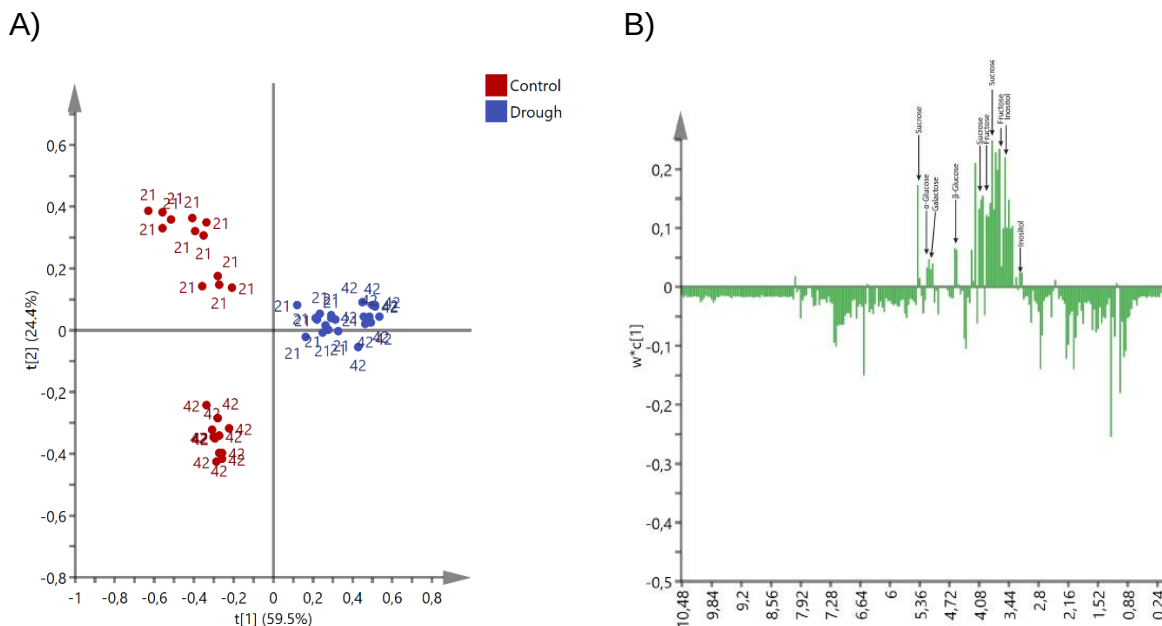


Figura 43. PLS-DA das amostras coletadas aos 21 dias após o plantio (DAP) e 42 DAP mostrando o gráfico de scores de dispersão comparando os tratamentos mantidos em estresse hídrico e condição normal (A); Gráfico de loadings (B) indicando os sinais (metabólitos) que mais contribuíram para a separação dos grupos no eixo do PC1 do gráfico de PLS-DA.

Os sacarídeos (frutose, α - e β -glicose, sacarose, galactose e inositol) foram os principais metabólitos que aumentaram no eucalipto devido ao estresse hídrico (Figura 43-B). A influência do estresse hídrico foi tão intensa que as amostras coletadas aos 21 DAP e 42 DAP se agruparam em PC1 positivo, independentemente da época avaliada. Há, no entanto, uma separação clara ao longo do PC2 em relação à época de coleta das amostras, para o grupo controle (sem estresse hídrico) (Figura 43-A). Nesta condição, o grupo coletado aos 21 DAP apresentou maiores teores de metabólitos primários, enquanto o grupo dos 42 DAP apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (dados não apresentados).

Para verificar a influencia do etil-trinexapac no metabolismo do eucalipto, foi selecionado, isoladamente, as amostras sem estresse hídrico coletadas aos 21 DAP. Optou-se pela escolha deste grupo, uma vez que nesse período o potencial estimulatório do produto, nas plantas, já havia sido expressado, conforme observado nas Figuras 32-A, C, D, E e F.

O modelo construído para a época de coleta aos 21 DAP (Figura 44) utilizou cinco componentes para explicar a variação do conjunto de dados, com R^2X de 93,4%. A Figura 44-A mostra o gráfico de pontuação dos componentes principais, que representaram 80,8% da variância, sendo 62,8% para PC1 e 18,1% para PC2.

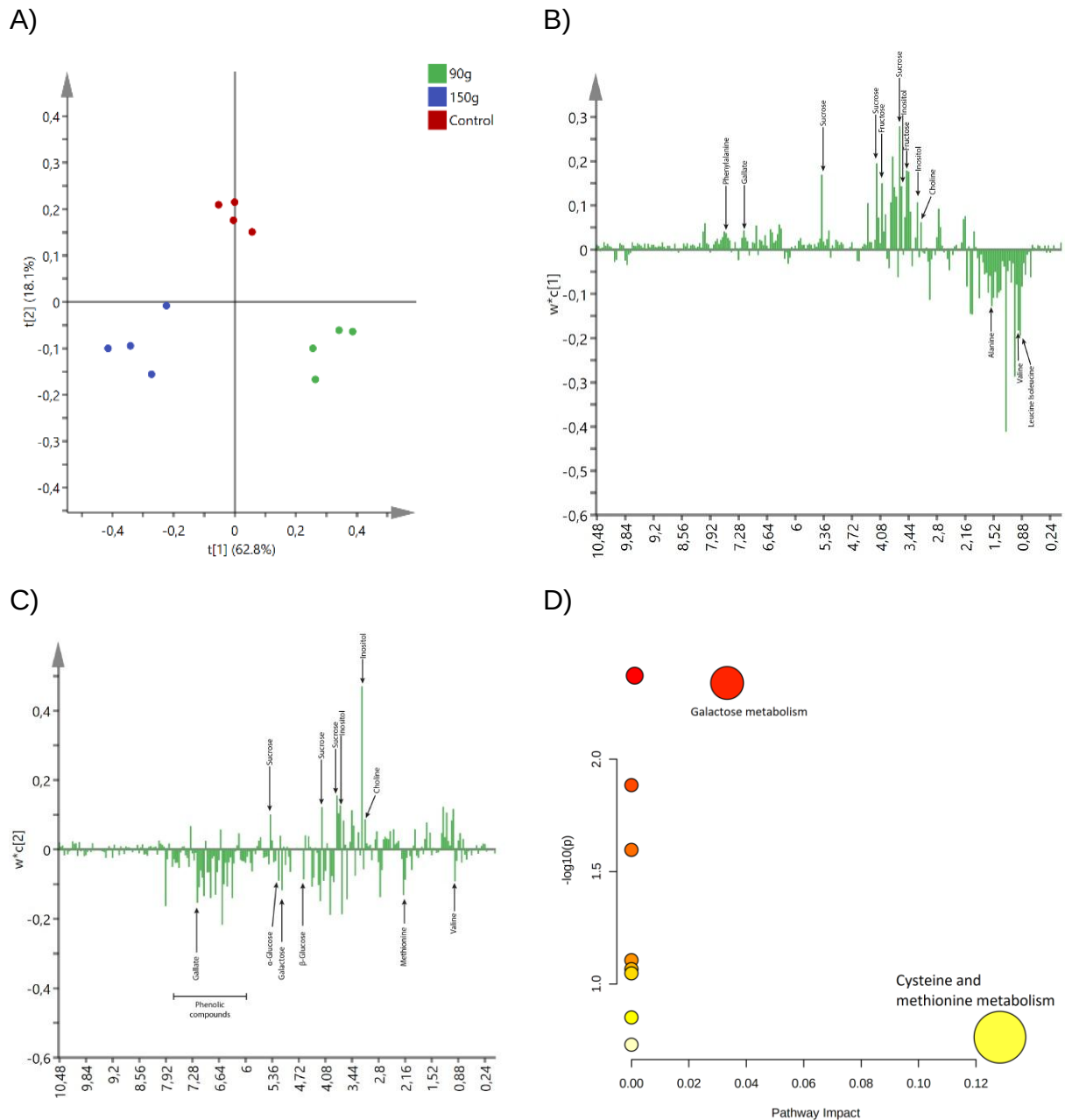


Figura 44. PLS-DA das amostras coletadas aos 21 dias após o plantio (DAP), na condição sem estresse hídrico, mostrando o gráfico de scores de dispersão comparando as doses de etil-trinexapac (A); Gráfico de loadings (B) indicando os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos no eixo do PC1 do gráfico de PLS-DA; Gráfico de

loadings (C) indicando os metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos no eixo do PC2; Gráfico indicando as rotas metabólicas mais afetadas pela aplicação de etil-trinexapac (D). 90 g e 150 g = doses de 90 e 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac, respectivamente.

A Figura 44-A mostra uma separação pronunciada entre os grupos testados. O grupo controle foi deslocado para o eixo positivo de PC2, enquanto as amostras tratadas com etil-trinexapac foram agrupadas em PC2 negativo. Também foi possível detectar diferentes clusters com base nas diferentes doses do produto testadas, em que as amostras pulverizadas com 90 g i.a. ha⁻¹ foram agrupadas em PC1 positivo, e as de 150 g i.a. ha⁻¹, em PC1 negativo. Os compostos fenólicos, α - e β -glicose, galactose, metionina e valina foram os principais metabólitos que aumentaram no eucalipto em decorrência da aplicação de etil-trinexapac, conforme observado no gráfico de loadings para o PC2 (Figura 44-C). Além disso, para a distinção das doses, foi observado uma maior quantidade de aminoácidos (alanina, valina e leucina) nas amostras tratadas com 150 g i.a. ha⁻¹, enquanto que para a menor dose, os metabólitos mais abundantes foram os açúcares (como sacarose, frutose e inositol) além de fenilalanina e galato (Figura 44-B). Com a aplicação do produto, as rotas mais afetadas foram as do metabolismo da cisteína e metionina, bem como a do metabolismo da galactose (Figura 44-D).

5. DISCUSSÃO

A redução nas características de trocas gasosas observadas em ambos experimentos, para os tratamentos com restrição hídrica (Figuras 3 e 23 a 27), considerando-se as médias das doses de etil-trinexapac, estão de acordo com diversos trabalhos já realizados com eucalipto (Susiluoto e Berninger, 2007; Granda et al., 2011; Correia et al., 2014; 2018). Esses resultados se justificam pelo fato de que a água desempenha um importante papel para a manutenção do metabolismo celular (Warren et al., 2011), uma vez que suas propriedades influenciam diretamente os constituintes da célula, como as estruturas das proteínas, ácidos nucleicos, membranas, entre outros (Chaves et al., 2003).

Quando há limitação da disponibilidade hídrica, o fechamento estomático é uma das primeiras respostas observadas para plantas nessas condições (Correia et

al., 2014; Utkhao e Yingjajava, 2015). Este processo restringe a perda de água por evapotranspiração e ajuda a manter o balanço hídrico na folha. Trabalhos recentes têm demonstrado que tal resposta é resultado de uma complexa rede de sinalização da qual o ácido abscísico (ABA) apresenta função primordial (Zhang et al., 2006; Jiang e Hartung, 2008), inclusive sendo reportado em plantas de eucalipto em condições de restrição hídrica (Granda et al., 2011; Correia et al., 2014; 2018).

Através das análises de metabolômica, foi observado que as plantas mantidas sob restrição hídrica obtiveram uma maior concentração de carboidratos (frutose, α - e β -glicose, sacarose, galactose e inositol) nos tecidos foliares em comparação ao tratamento controle (Figura 43-B). Essa resposta permite um efetivo ajuste osmótico nas células, o qual é um dos processos que possibilita com que as plantas tolerem certos períodos de estresse hídrico sem que haja um dano irreversível no metabolismo celular (Chaves et al., 2003). Plantas de eucalipto sob restrição hídrica podem sintetizar e acumular ácidos orgânicos, açúcares (como glicose, sacarose e inositol) e aminoácidos (como prolina – Figura 38) (Merchant et al., 2006; Warren et al., 2007; Foito et al., 2009; Warren et al., 2012), os quais, além de contribuírem para a diminuição do potencial osmótico e consequente entrada de água nas células, também protegem as membranas das células e os complexos proteicos, possibilitando com que o metabolismo celular continue funcionando (Chaves et al., 2003).

Em contrapartida, o processo de fechamento estomático também foi descrito como importante consequência para a diminuição do CO₂ no parênquima fotossintético em respostas de longo prazo (Chaves et al. 2003, Vassileva et al. 2011), causando limitada assimilação de carbono, conforme observado no segundo experimento (Figuras 23 a 27). Já no primeiro experimento, constatou-se que a restrição hídrica resultou em maiores quantidades de carbono interno (Figura 3-D), provavelmente devido à menor condutância estomática (Figura 3-C). Apesar disso, as plantas desse tratamento apresentaram menores valores de eficiência de carboxilação instantânea (Figura 3-F), o que sugere que as moléculas de carbono não estavam sendo utilizadas na etapa química da fotossíntese devido à diminuição no metabolismo fotossintético resultante da limitação de água, a qual é importante

no processo de regeneração da RuBP e na atividade da Rubisco (Lawlor, 2002; Parry et al., 2002).

Plantas de eucalipto sob restrição hídrica tendem a apresentar uma atividade limitada de trocas gasosas (Chaves et al. 2003; Susiluoto e Berninger, 2007; Correia et al., 2014; Utkhao e Yingjajava, 2015) assim como observado em ambos experimentos (Figuras 3 e 23 a 27). Esses resultados recorrentes são justificados pelo fato de a água ter participação direta na etapa fotoquímica da fotossíntese, uma vez que suas moléculas atuam como doadora de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons. Além disso, também são essenciais na produção de ATP, pois após o processo de fotólise da água, os prótons H^+ são liberados no interior do tilacóide para posterior utilização pela bomba ATP-sintase (Lawlor, 2002; Parry et al., 2002).

No que tange aos valores de clorofila total, para o primeiro experimento foi observado que a partir dos 20 DAP (Figura 8) a quantidade deste pigmento nas folhas mantidas sob restrição hídrica foram maiores em relação àquelas em capacidade de campo. Correia et al. (2014) encontraram resultados semelhantes em mudas de *E. globulus*, bem como maior concentração de carotenoides, e atribuíram essa resposta à menor expansão foliar, fato observado no primeiro experimento somente para a dose de 150 g i.a. ha^{-1} , ao final do período experimental (Tabela 9-D) e para o segundo experimento até os 42 DAP (Figura 36-E). Os autores ressaltaram que as altas quantidades de carotenóides podem desempenhar fator importante na proteção das clorofilas contra a fotodegradação, mantendo, com isso, a capacidade fotossintética das plantas. Por outro lado, outra hipótese para a manutenção de altas quantidades desses pigmentos em plantas de eucalipto foi levantada por Susiluoto e Beringer (2007). Os autores observaram que em condições de restrição hídrica, há uma maior relação raiz/parte aérea, também reportada por Li e Wang (2003), aumentando, com isso, a capacidade de exploração do solo e absorção de água e nutrientes (principalmente nitrogênio).

Para as avaliações de eficiência quântica do fotossistema II, foi possível observar maiores valores ($p < 0,05$) nos tratamentos sem restrição hídrica (Figuras 6 e 2.30), mas, apesar desta diferença, é importante ressaltar que todos os valores anotados estão dentro da faixa de plantas saudáveis (0,75 a 0,85; Schreiber et al.

1994). Susiluoto e Berninger (2007) e Correia et al. (2014) encontraram resultados diferentes trabalhando com *E. microtheca* e *E. globulus*, respectivamente. Em ambos trabalhos, os autores relataram que as plantas estressadas obtiveram maiores valores para F_v/F_m , e relacionaram esses resultados à maior concentração de clorofila nas folhas. Assim, uma possível justificativa para a diferença entre os resultados encontrados aqui, e os trabalhos anteriormente citados, se deve ao fato de que as avaliações de F_v/F_m ocorreram até os 15 DAP, momento em que a concentração de clorofila nas plantas dos tratamentos sem restrição hídrica ainda possuíam maiores quantidades deste pigmento (Figuras 8 e 31-C).

Mesmo havendo diferenças nas trocas gasosas entre os tratamentos com e sem restrição hídrica, relatados anteriormente, as testemunhas sem aplicação de etil-trinexapac não diferiram entre si para produção de biomassa ao final do primeiro experimento (Tabela 9-E), conduzido em 40% da capacidade de campo. Assim, foi feita a adaptação dos valores de restrição hídrica para 30% da capacidade de campo, resultando em uma massa seca total 87% maior para os eucaliptos com irrigação abundante (Figura 36-E).

Em relação ao efeito das doses de etil-trinexapac nas trocas gasosas do primeiro experimento, não foi observado resposta positiva para essas características em ambas condições hídricas até os 15 DAP (Figuras 4 e 5). Apesar disso, não houve efeito deletério às características fotossintéticas do eucalipto no presente experimento, o que mantém a hipótese levantada por Pires et al. (2013), de que este produto não é nocivo ao aparato fotossintético das plantas (Figuras 7 e 12).

No primeiro experimento, foi verificado que a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ foi a que proporcionou o maior incremento na massa seca total (MST) do eucalipto aos 90 DAP, com acréscimo de 49,7% (Figura 12). Em experimento conduzido em condições de campo, Correia e Villela (2015) relataram acréscimo de 29% no diâmetro da copa do eucalipto aos 45 dias após a aplicação de 200 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Neste caso, o produto foi aplicado aos 46 DAP das mudas, ou seja, as plantas já se encontravam com o sistema radicular estabelecido. Bacha et al. (2017), trabalhando com o clone I-144 de *E. urophylla* até os 90 DAP, relataram ganhos de até 30% nesta mesma característica, utilizando 30 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac. Já Pires et al. (2019) obtiveram aumento de 76% na biomassa da parte aérea aos 35

DAP, para o clone GG-100 de *E. urograndis*, utilizando a dose de 15 g i.a. ha⁻¹. Ganhos em produtividade (13,3%) também foram observados por Bacha et al. (2018), ao pulverizarem 30 g i.a. ha⁻¹ deste produto, e conduzirem experimento por 81 DAP em condições limitantes de fósforo.

Como descrito acima, vários trabalhos verificaram efeito positivo de etil-trinexapac em distintos clones de eucalipto, no entanto, nenhum deles teve como objetivo principal avaliar a dose que causa o maior estímulo ao crescimento das plantas. Assim, os resultados obtidos no primeiro experimento podem ser um ponto de partida para futuros estudos que objetivem avaliar o efeito de etil-trinexapac em condições de campo, inclusive considerando aplicações sequenciais, com o intuito de se manter tal efeito positivo até a colheita do eucalipto.

No que tange às doses do produto, foi observado que a água foi condição limitante para a não obtenção do crescimento extra, proporcionado pelo etil-trinexapac, uma vez que somente as plantas sem restrição hídrica obtiveram o efeito estimulatório (Tabela 9-E). Esses resultados estão em concordância com os obtidos no segundo experimento, conduzidos em 30% da capacidade de campo (condição mais estressante em comparação ao 1º experimento). No entanto, vale ressaltar a tendência de maiores valores para a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ nas características de matéria seca após a adubação (Figuras 34-C, D e F), e da maior área foliar para a dose de 90 g i.a. ha⁻¹ (Figura 34-E).

O etil-trinexapac é uma acilciclohexanediona que atua nas fases finais da biossíntese da giberelina (Rademacher, 2000). Apesar disso, Rademacher (2016) ressalta que em alguns casos é possível haver uma resposta paradoxal das plantas a esse produto, uma vez que é esperado que haja uma drástica redução no nível de ácido giberélico ativo (GA₁) por conta da inibição da enzima 3β-hidroxilase (Nakayama et al., 1990) e assim aumentando acentuadamente seu precursor biossintético imediato, o GA₂₀ (Adams et al., 1992; Davies, 1995). No entanto, além de evitar a hidroxilação na posição 3β, para a formação de GA₁ (Adams et al., 1992), Hisamatsu et al. (1998) observou que este produto também inibe a hidroxilação na posição 2β, evitando com que as giberelinas GA₁ já existentes na planta sejam transformadas em GA₈ (forma inativa do composto). Assim, três hipóteses são levantadas como as causas dos efeitos promotores observados nas plantas de

eucalipto, as quais podem ocorrer simultaneamente e espera-se poder serem elucidadas com as análises de dosagem hormonal que serão realizadas em breve, são elas: i) o acúmulo de GA₁, devido à não conversão para GA₈, prolongou sua ação nas plantas; ii) o acúmulo de GA₂₀, devido à sua não conversão para GA₁, fez com que houvesse uma superexpressão de GA₁ após a degradação do etil-trinexapac; iii) a oscilação na rota de biossíntese da giberelina, ocasionada pelo etil-trinexapac, ocasiona um desbalanço hormonal na planta, podendo, assim, haver uma superprodução de outros hormônios (ou um efeito sinérgico entre eles), resultando nos efeitos positivos observados aqui e em outros trabalhos (Pires et al., 2013; 2019; Correia e Villela, 2015; Bacha et al., 2017, 2018).

Como não foram encontradas diferenças constantes nas características fotossintéticas do eucalipto nos primeiros 15 dias após a aplicação do produto (Figuras 4, 5 e 7) no primeiro experimento; e também especialmente pelo fato de no segundo experimento a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ de etil-trinexapac ter proporcionado menores valores de assimilação líquida de CO₂ que os demais tratamentos (Figuras 13-A a 17-A) nas avaliações iniciais, obtendo, apesar disso, massa seca do caule 63,2% maior que a testemunha aos 42 DAP (Figura 32-C); hipotetizamos que um aumento no metabolismo fotossintético do eucalipto possa ter ocorrido mais tardiamente, como é possível observar nas análises de metabolismo primário das plantas coletadas aos 42 DAP (Figura 41), em que houve a distinção dos tratamentos comparados, em sua maioria, por carboidratos. Com o gráfico de loadings dos 21 DAP, foi possível constatar que os metabólitos metionina, α - e β -glicose, galactose, valina e os compostos fenólicos, foram as substâncias que mais contribuíram para a distinção entre os grupos das plantas aplicadas e do controle (Figura 44-C). No entanto, devido à impossibilidade de quantificação dos compostos, não foi possível mensurar com exatidão a participação dessas moléculas na resposta biológica. Apesar disso, já se sabe que as rotas de metabolismo cisteína, metionina e da galactose apresentam elevada importância no processo (Figura 44-D). Assim, para estudos futuros, sugere-se a utilização de um LC-MS (cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas) para a quantificação dos metabólitos encontrados.

Os processos fisiológicos que ocasionam o efeito estimulatório em decorrência da aplicação de etil-trinexapac ainda não foram elucidados, de todo modo, mais pesquisas que objetivem estudar os efeitos deste regulador de crescimento vegetal na cultura do eucalipto devem ser realizadas, principalmente trabalhos que avaliem as alterações hormonais nas plantas. Assim, a compreensão deste processo pode levar a aumentos de produtividade em um futuro próximo.

6. CONCLUSÕES

O etil-trinexapac ocasionou efeito estimulatório nas mudas de eucalipto, sendo a dose de 150 g i.a. ha⁻¹ aquela que proporcionou maior crescimento às plantas. Apesar disso, este produto não proporcionou a *hormesis* completa (efeito bifásico, sendo estimulatório em baixas doses, seguido de efeito deletério em altas doses) no eucalipto, não sendo tóxico às plantas até a dose de 300 g i.a. ha⁻¹.

A restrição hídrica foi condição limitante ao crescimento do eucalipto, assim, as plantas nessas condições não sofreram efeito estimulatório do etil-trinexapac.

O etil-trinexapac ocasionou alterações no metabolismo primário das plantas de eucalipto cultivadas sem restrição hídrica, possivelmente resultando em uma maior produção de carboidratos. No entanto, mais pesquisas que objetivem estudar os efeitos deste regulador de crescimento vegetal na cultura do eucalipto devem ser realizadas, principalmente trabalhos que avaliem as alterações hormonais nas plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTAS. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2012**. 2013. Disponível em: < <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-abraf13-br.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2017.
- ADAMS, R.; KERBER, E.; PFISTER, K.; WEILER, W. **Studies on the action of the new growth retardant CGA 163'935 (cimectacarb)**. In: Progress in plant growth regulation. *Edited by* C.M. Karssen, L.C. van Loon and D. Vreugdenhil. Dordrecht: Kluwer Academic, pp. 818-827, 1992.
- BACHA, A.L.; MARTINS, P.F.R.B.; ALVES, P.L.C.A.; PAULA, R.C. Trinexapac-ethyl causes stimulatory effect on eucalyptus initial growth under nutritional deficiency. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 48, p. 94-100, 2018.
- BACHA, A.L.; MARTINS, P.F.R.B.; CARREGA, W.C.; ALVES, P.L.C.A.; PAULA, R.C. Trinexapac-ethyl causes stimulatory effect on the initial growth of *Eucalyptus urograndis* clones. **Journal of Agricultural Science**, v.9, n.10, p.189-197, 2017.
- BELZ, R.G.; CEDERGREEN, N. Parthenin hormesis in plants depends on growth conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, n.3, p.293-301, 2010.
- BELZ, R.G.; DUKE, S.O. Herbicides and plant hormesis. **Pest Management Science**, v.70, n.5, p.698-707, 2014.
- BRITO, I.P.F.S.; TROPALDI, L.; CARBONARI, C.A.; VELINI, E.D. Hormetic effects of glyphosate on plants. **Pest Management Science**, 2017.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. Defining hormesis. **Human Experimental Toxicology**, v.21, p.91-97, 2002.
- CALDAS, L.S.; MACHADO, L.L.; CALDAS, S.C.; CAMPOS, M.L.; CALDAS, J.A.; PHARIS, R.P.; PEREIRA-NETTO, A.B. Growth-active gibberellins overcome the very slow shoot growth of *Hancornia speciosa*, an important fruit tree from the Brazilian "Cerrado". **Trees**. v. 23, p. 1229-1235, 2009.
- CARBONARI, C.A.; MESCHEDE, D.K.; VELINI, E.D. Efeitos da aplicação de glyphosate no crescimento inicial de mudas de eucalipto submetidas a dois níveis de adubação fosfatada. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GLYPHOSATE, 1.,

- 2007, Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2007. v. 1, 342p., p. 68-70.
- CARVALHO, L.B.; ALVES, P.L.C.A.; DUKE, S.O. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.85, n.2, p.813-821, 2013.
- CEDERGREEN, N.; FELBY, C.; PORTER, J.R.; STREIBIG, J.C. Chemical stress can increase crop yield. **Field Crop Research**, v. 114, n. 1, p. 54-57, 2009.
- CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J.C.; KUDSK, O.; MATHIASSEN, S.K.; DUKE, S.O. The occurrence of hormesis in plants and algae. **Dose-Response**, v. 5, n. 2, p. 150-162, 2007.
- CHAVES MM, MAROCO JP, PEREIRA JS. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Funct Plant Biol** 30: 239–264, 2003.
- CORREIA, B.; HANCOCK, R.D.; VALLEDOR, L.; PINTO, G. Gene expression analysis in *Eucalyptus globulus* exposed to drought stress in a controlled and a field environment indicates different strategies for short- and longer-term acclimation. **Tree Physiology** 00, (2018), 1–17, 2018. doi:10.1093/treephys/tpy067
- CORREIA, B.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; NEVES, L.; BROSSA, R.; DIAS, M.C.; COSTA, A.; CASTRO, B.B.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C.; CHAVES, M.M.; PINTO, G. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, v.150, p.580-592, 2014.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N. COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n.48/49, p.107-116, 1995.
- CORREIA, N.; VILLELA, G.B. Trinexapac-ethyl and sulfometuron-methyl selectivity to young eucalyptus plants. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p.259-266, 2015.
- DAVIES. P. J. **Plant hormones physiology biochemistry and molecular biology**. 2.ed. Netherlands: Klumer Academic Publishes, 1995. 823 p.
- DUKE, S.O.; CEDERGREEN, N.; VELINI, E.D.; BELZ, R.G. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? **Outlooks Pest Management**, v.17, n.1, p.29-33, 2006.

- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, p. 288, 1994.
- FLEXAS, J.; BOTA, J.; ESCALONA, J.M.; SAMPOL, B.; MEDRANO, H. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions. **Functional Plant Biology**, v.29, p.461-471, 2002.
- FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; DIAZ-ESPEJO, A.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell and Environment**, v.31, p.602-621, 2008.
- FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M.; HANSON, D.T.; BOTA, J.; OTTO, B.; CIFRE, J.; MCDOWELL, N.; MEDRANO, H.; KALDENHOFF, R. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. **The Plant Journal**, v.48, p.427-439, 2006.
- FOITO, A.; BYRNE, S.L.; SHEPHERD, T.; STEWART, D.; BARTH, S. Transcriptional and metabolic profiles of *Lolium perenne* L. genotypes in response to a PEG-induced water stress. **Plant Biotechnology Journal**, (2009), 7, 719–732.
- GARAU, A.M.; LEMCOFF, J.H.; GHERSA, C.M.; BEADLE, C.L. Water stress tolerance in *Eucalyptus globulus* Labill. subsp. *maidenii* (F. Muell.) saplings induced by water restrictions imposed by weeds. **Forest Ecology and Management**, v.255, n.7, p.2811-2819, 2008.
- GONÇALVES, M.R.; PASSOS, C.A.M. Crescimento de cinco espécies de eucalipto submetidas a déficit hídrico em dois níveis de fósforo. **Ciência Florestal**, v.10, n.2, p.145-161, 2000.
- GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e de híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* via *Agrobacterium***. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- GRANDA, V.; CUESTA, C.; ALVAREZ, R.; ORDÁS, R.; CENTENO, M.L.; RODRÍGUEZ, A.; MAJADA, J.P.; FERNÁNDEZ, B.; FEITO, I. Rapid responses of C14 clone of *Eucalyptus globulus* to root drought stress: time-course of hormonal and physiological signaling. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.661-670, 2011.
- GRIGGS, D.L.; HEDDEN, P.; TEMPLE-SMITH, K.E.; RADEMACHER, W. Inhibition of gibberellin 2 β -hydroxylases by acylcyclohexanedione derivatives. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2513-2517, 1991.

- HANBA, Y.T.; SHIBASAKA, M.; HAYASHI, Y.; HAYAKAWA, T.; KASAMO, K.; TERASHIMA, I.; KATSUHARA, M. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v.45, n.5, p.521-529, 2004.
- HEDDEN, P. Gibberellin biosynthesis in higher plants. **Annual Plant Reviews**, v.49, p.37-72, 2016.
- HEDDEN, P.; SPONSEL, V.M. A century of gibberellin research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.34, n.4, p.740-760, 2015.
- HISAMATSU, T.; KOSHIOKA, M.; KUBOTA, S.; KING, R.W. Effect of gibberellin A4 and GA biosynthesis inhibitors on growth and flowering of stock [*Matthiola incana* (L.) R. Br.]. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.67, n.4, p.537-543, 1998.
- IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. Relatório anual de 2020. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf> Acesso em: 10 de setembro de 2021.
- JIANG, F.; HARTUNG, W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. **Journal of Experimental Botany**, v.59, p.37-43, 2008.
- KIM, H.; CHOI, Y.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nat Protoc** 5, 536–549, 2010. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>
- KÖPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. Fondo de Cultura Económica. México, 1948. 478p.
- LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p.871-885, 2002.
- LEWIS, J.; BAKER, J.M.; BEALE, M.H.; WARD, J.L. **Metabolite profiling of GM plants: the importance of robust experimental design and execution**. In: Genomics for Biosafety in Plant Biotechnology; Nap, J. P. H., Atanassov, A., Stiekema, W. J., Eds.; IOS Press, pp 47–57, 2004.
- LI C., WANG K. Differences in drought responses of three contrasting *Eucalyptus microtheca* F. Muell populations. **Forest Ecology and Management**. 2003; 179:377-385.

MERCHANT, A.; TAUSZ, M.; ARNDT, S.K.; ADAMS, M.A. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 Eucalyptus species suggest contrasting physiological responses to water deficit. **Plant Cell and Environment**, (2006), 29, 2017–2029.

MCDONALD, L.; MORGAN, T.; JACKSON, P. The effect of ripeners on the CCS of 47 sugarcane varieties in the Burdekin. **Proceedings of the Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, v. 23, p. 102-108, 2001.

MIYAZAWA, S.I.; YOSHIMURA, S.; SHINZAKI, Y.; MAESHIMA, M.; MIYAKE, C. Deactivation of aquaporins decreases internal conductance to CO₂ diffusion in tobacco leaves grown under long term drought. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 553-564, 2008.

MODDUS. Bula. Disponível em: <https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/moddus1219.pdf> Acesso em: 05 setembro 2021.

MOURA, V.P.G. **O germoplasma de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake no Brasil**. Brasília: EMBRAPA Recursos genéticos e biotecnologia. 2004. 12 p. (Comunicado técnico, n. 111), Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/174980/1/cot111.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

NAKAYAMA, K. et al. Effects of a plant-growth regulator, prohexadione, on the biosynthesis of gibberellins in cell-free systems derived from immature seeds. **Plant Cell Physiol**, v. 31, p. 1183-1190, 1990.

NAMBIAR, E.; SANDS, R. Competition for water and nutrients in forests. **Canadian Journal of Forest Research**, v.23, n.10, p.1955-1968, 1993.

NASCIMENTO, V.; ARF, O.; SILVA, M.G.; BINOTTI, F.F.S.; RODRIGUES, R.A.F.; ALVAREZ, R.C.F. Uso do regulador de crescimento etil-trinexapac em arroz de terras altas. **Bragantia**, v.68, n.4, p.921-929, 2009.

PARRY, M.A.; ANDRALOJC, P.J.; KHAN, S.; LEA, P.J.; KEYS, A.J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v.89, p.833-839, 2002.

PEREIRA, F.C.M.; NEPOMUCENO, M.P.; PIRES, R.N.; PARREIRA, M.C.; ALVES, P.L.C.A. Response of eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants at different doses of glyphosate. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.1, p.66-74, 2013.

- PIRES, R. N.; BACHA, A. L.; NEPOMUCENO, M. P.; ALVES, P. L. C. A. Can trinexapac-ethyl stimulate the initial growth of eucalyptus? *Ci. Fl.*, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 385-395, jan./mar., 2019. <https://doi.org/10.5902/1980509815326>
- PIRES, R.N. **Influência do etil-trinexapac no crescimento inicial do eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.
- PIRES, R.N.; PEREIRA, F.C.M.; NEPOMUCENO, M.P.; ALVES, P.L.C.A. Effects of the simulated drift of ripeners on *Eucalyptus urograndis*. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n.12, p.78-86, 2013.
- PITELLI, R.A.; MARCHI, S.R. Interferência das plantas invasoras nas áreas de reflorestamento. Seminário técnico sobre plantas daninhas e o uso de herbicidas em reflorestamento, 3, Belo Horizonte, 1991. **Anais...**Belo Horizonte, 1991.p.1-11.
- RADEMACHER, W. Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. **Annual Plant Reviews**, v.49, p.359-403, 2016.
- RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.501-531, 2000.
- RADEMACHER, W. Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.34, n.4, p.845-872, 2015.
- ROCHA, M.G.B.; PIRES, I.E.; XAVIER, A.; CRUZ, C.D.; ROCHA, R.B. Avaliação genética de progênies de meios-irmãos de *Eucalyptus urophylla* utilizando os procedimentos REML/BLUP e E(QM). **Ciência Florestal**, v.16, n.4, p.369-379, 2006.
- SHVALEVA, A.L.; COSTA E SILVA, F.; BREIA, E.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; ALMEIDA, M.H.; MAROCO, J.P.; RODRIGUES, M.L.; PEREIRA, J.S.; CHAVES, M.M. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, v.26, p.239-248, 2006.
- SILVA, W.; SEDIYAMA, T.; SILVA, A.A.; CARDOSO, A.A. Índice de consumo e eficiência do uso da água em eucalipto, submetido a diferentes teores de água em convivência com a braquiária. **Floresta**, v.34, p.325-335, 2004.
- SOUTHAM, C.M.; EHRLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**, v.33 p.517-524, 1943.

- STAPE, J.; BINKLEY, D.; RYAN, M.G.; GOMES, A.N. Water use, water limitation, and water use efficiency in a eucalyptus plantation. **Bosque**, v.25, n.2, p.35-41, 2004
- SUSILUOTO S.; BERNINGER F. Interactions between morphological and physiological drought responses in *Eucalyptus microtheca*. **Silva Fennica**, v.41, p.221-233, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- THE PLANT LIST. **Version 1**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em: 05 jun. 2017.
- UTKHAO, W.; YINGJAJAVAL, S. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. **Trees** 29: 1581–1592, 2015. 10.1007/s00468-015-1240-1
- VASSILEVA V, SIGNARBIEUX C, ANDERS I, FELLER U. Genotypic variation in drought stress response and subsequent recovery of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Res* 124: 147–154, 2011.
- VELINI, E.D.; ALVES, E.; GODOY, M.C.; MESCHEDE, D.K.; SOUZA, R.T.; DUKE, S.O. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v.64, n.4, p.489-496, 2008.
- VELINI, E.D.; TRINDADE, M.L.B.; BARBERIS, L.R.M.; DUKE, S.O. Growth Regulation and other secondary effects of herbicides. **Weed Science**, v.58, n.3, p.351-354, 2010.
- VELLINI, A.L.T.T.; DE PAULA, N.F.; ALVES, P.L.C.A.; PAVANI, L.C.; BONINE, C.A.V.; SCARPINATI, D.A.; DE PAULA, R.C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, v.32, n.4, p.651-663, 2008.
- WARD, J.L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M.H. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v.62, p.949-957, 2003.
- WARREN, C.R.; ARANDA, I.; CANO, F.J. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp **Plant, Cell and Environment** (2011) 34, 1609–1629.

WARREN, C.R.; ARANDA, I.; CANO, F.J. Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. **Metabolomics**, (2012), 8(2), 186–200.

WARREN, C.R.; BLEBY, T.M.; ADAMS, M.A. Changes in gas exchange versus leaf solutes as a means to cope with summer drought in *Eucalyptus marginata*. **Oecologia**, (2007), 154, 1–10.

ZHANG, J.; JIA, W.; YANG, J.; ISMAIL, A.M. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crop Research**, v.97, p.111-119, 2006.