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

RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B E ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE EUCALIPTO

NATÁLIA CORNIANI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP
Julho - 2009

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

RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B E ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE EUCALIPTO

NATÁLIA CORNIANI

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Ana Catarina Cataneo

Co-Orientadora: Prof[a] Dr[a] Inês Cechin

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP
Julho – 2009

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

Corniani, Natália, 1984-
C795r Relação entre estresse de radiação ultravioleta-B e óxido nítrico em plantas de eucalipto / Natália Corniani. - Botucatu : [s.n.], 2009.
xi, 76 f. : il. color, gráfs.,tabs.

Dissertação(Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2009
Orientador: Ana Catarina Cataneo
Co-orientador: Inês Cechin
Inclui bibliografia

1. Estresse oxidativo. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Eucalyptus urograndis. I. Cataneo, Ana Catarina. II.Cechin, Inês. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE DE RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B E ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE EUCALIPTO.

ALUNA: NATÁLIA CORNIANI

ORIENTADORA: PROFª DRª ANA CATARINA CATANEO
CO-ORIENTADORA: PROFª DRª INÊS CECHIN

Aprovado pela Comissão Examinadora

Ana Catarina Cataneo
PROFª DRª ANA CATARINA CATANEO

Leonardo Cesar Ferreira
PROF. DR. LEONARDO CESAR FERREIRA

Terezinha de Fátima Fumis
PROFª DRª TEREZINHA DE FÁTIMA FUMIS

Data da Realização: 22 de julho de 2009.

"Há momentos na vida em que sentimos tanto
a falta de alguém que o que mais queremos
é tirar esta pessoa de nossos sonhos
e abraçá-la.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros
e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar
porque um belo dia se morre."

Clarice Lispector

Dedico

Aos meus pais, pela luta e orgulho deste feito alcançado.

A minha irmã por sempre torcer, de coração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS, por ter me concedido à vida repleta de alegrias e oportunidades, pela força nos momentos de aflição e especialmente por ter permitido o alcance de mais este ideal;

Às minhas avós Percy e Sebastiana (*In memoriam*), com as quais tive o privilégio de conviver por alguns anos, o suficiente para as tornarem imprescindíveis e inesquecíveis em minha vida. Onde estiverem tenho certeza que zelam e torcem por mim;

Aos meus pais, José Augusto e Terezinha aos quais sou infinitamente grata por revestirem minha existência de amor, pelo apoio incondicional e por terem sacrificado muitas vezes seus sonhos em favor dos meus; Essa conquista não é somente minha, mas nossa, pois sem vocês nada seria possível;

À minha irmã e madrinha Camila, pelo amor e carinho demonstrados, pelas cobranças que me tornam mais forte, pelas lágrimas muitas vezes derramadas nos momentos de saudade.

Ao meu companheiro durante este percurso Rodolfo, pelo auxílio valioso, pelo ombro carinhoso nos momentos de fraqueza, por acreditar em meu potencial, pela alegria irradiante de quando estamos juntos e principalmente por me mostrar o verdadeiro sentido do amor. Que o universo conspire eternamente por nós!

À Professora Doutora Ana Catarina Cataneo, pela orientação, confiança, oportunidade, ensinamentos e acima de tudo a amizade;

À minha co-orientadora Professora Doutora Inês Cechin, pela prontidão em sanar dúvidas, apoio e incentivo, disponibilização da casa de vegetação para desenvolvimento deste trabalho;

À professora, orientadora e amiga Terezinha de Fátima Fumis, pelo auxílio na execução deste trabalho, pelo cuidado maternal, lições de vida, momentos compartilhados. Você é muito especial, teve e sempre terá grande importância em minha vida;

À amiga Lígia e toda sua família, exemplos de luta, honestidade, inteligência e capacidade. Vocês são seres especiais e iluminados sendo um grande privilégio poder desfrutar desta amizade;

À Bela e Belinha, Alessandra, Érika, Talita e Roberta com as quais não somente compartilhei moradia, mas experiências, dificuldades, muitas alegrias, por amenizarem a ausência daqueles que se encontravam distantes, pelas palavras de incentivo;

Aos colegas de Pós-Graduação, Giselaine, Gisele, Joseane, Leonardo, pela convivência amigável;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Certamente eu não teria concluído este trabalho sem a ajuda de vocês. Carregaram-me no colo quando precisei, me reergueram na hora certa e me deram força e confiança para acreditar e continuar. Cada um a seu modo.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização desse trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS IX
LISTA DE FIGURAS X
1 RESUMO 01
2 SUMMARY 03
3 INTRODUÇÃO 05
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 08
4.1 A cultura de *Eucalyptus* 08
4.1.1 O gênero *Eucalyptus* 08
4.1.2 Histórico 09
4.1.3 Importância econômica 11
4.2 Radiação ultravioleta-B 13
4.3 O estresse oxidativo em plantas 14
4.4 Mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo 17
4.5 Algumas enzimas antioxidantes 18
4.5.1 Superóxido dismutase 18
4.5.2 Peroxidases 20
4.6 Indicadores de estresse oxidativo 21
4.6.1 Lipoperóxidos. 21
4.6.2 Pigmentos fotossintéticos 23
4.7 Óxido nítrico 24
5 MATERIAL E METÓDOS 28
5.1 Experimento I 28
5.1.1 Material vegetal e delineamento experimental 28
5.1.2 Tratamentos 29
5.1.3 Quantificação dos teores de lipoperóxidos 31
5.2 Experimento II 32
5.2.1 Material vegetal e delineamento experimental 32

Página

5.2.2 Tratamentos 33
5.2.3 Avaliações bioquímicas 35
5.2.3.1 Obtenção das amostras 35
5.2.3.2 Quantificação dos teores de compostos fenólicos e antocianina. 35
5.2.3.3 Quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos 35
5.2.3.4 Quantificação dos teores de lipoperóxidos 36
5.2.3.5 Obtenção dos extratos enzimáticos 36
5.2.3.6 Atividade da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) 37
5.2.3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) 37
5.2.3.8 Quantificação dos teores de proteínas solúveis 39
5.3 Análise estatística 40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
6.1 Experimento I 41
6.2 Experimento II 43
7 CONCLUSÕES 56
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

LISTA DE TABELAS

Página

1. Dias de aplicação das doses de nitroprussiato de sódio (SNP) ou água e início da exposição à RUV-B, em plantas de eucalipto 33

2. Diferentes tratamentos de RUV-B e SNP aplicados em plantas de eucalipto..... 34

3. Comparação de médias e análise de variância do efeito da RUV-B nos teores de lipoperóxidos (MDA) em plantas de eucalipto aos 5, 10 e 15 dias após a exposição (DAE) à RUV-B em baixa (-RUV-B) e elevada incidência (+RUV-B) 42

4. Análise de Variância Fatorial da aplicação de SNP e da RUV-B nos teores de lipoperóxidos (MDA) e de pigmentos fotossintéticos em plantas de eucalipto 45

5. Análise de Variância Fatorial da aplicação de SNP e da RUV-B nos teores de compostos fenólicos e de antocianinas em plantas de eucalipto 49

6. Análise de Variância Fatorial da da aplicação de SNP e da RUV-B na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e pirogalol peroxidase (PG-POD) em plantas de eucalipto..... 52

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Distribuição das florestas plantadas de eucalipto por Estados em 2007 (ABRAF, 2008) 13

2. Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss 16

3. Esquema da ação da enzima SOD na eliminação de ERO 19

4. Esquema da ação da enzima POD na eliminação de ERO 20

5. Esquema da sequência de reações ocorrentes na peroxidação lipídica 22

6. Vista externa da casa de vegetação – FC/UNESP/Bauru 29

7. Sistema de lâmpadas (vista lateral) sobre as bancadas da casa de vegetação 30

8. Esquema de quantificação dos teores de lipoperóxidos 32

9. Tubetes com plantas de eucalipto, sem e com fita adesiva amarela, correspondendo aos tratamentos controle e com aplicações de SNP, respectivamente 34

10. Esquema da extração enzimática 36

11. Esquema da técnica para determinação da atividade da PG-POD 37

12. Esquema da técnica da determinação da atividade da superóxido dismutase 38

13. Conversão do NBT a “blue formazan”, promovida pelos radicais superóxido 39

14. Esquema da quantificação de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos 40

15. Nível de peroxidação lipídica (teor de MDA) em plantas de eucalipto no período de 5, 10 e 15 dias após início da exposição à RUV-B em baixa (-RUV-B) e alta incidência (+RUV-B). Os resultados representam médias ± erro de 4 repetições 43

16. Nível de peroxidação lipídica (teor de MDA) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições 45

17. Teores de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c), carotenóides (d) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições 47

18. Teores de compostos fenólicos (a) e de antocianinas (b) em plantas de eucalipto em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B,+RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições 50

19. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (a) e da pirogalol peroxidase (PG-POD) (b) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições 53

1. RESUMO

As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam notável capacidade de extração de água e nutrientes, assimilação fotossintética e crescimento, permitindo seu cultivo em ambientes considerados impróprios para muitas outras espécies. Além dos fatores ambientais atuando adversamente no desempenho das plantas, atualmente estas estão sujeitas aos efeitos das mudanças ambientais globais causadas pelas atividades antrópicas, tais como o aumento na incidência da radiação ultravioleta-B (RUV-B) em conseqüência da destruição da camada de ozônio. Estudos recentes têm mostrado que a RUV-B promove aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (ERO), ocasionando estresse oxidativo nas plantas. Entretanto, as plantas apresentam um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, constituído de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), além de outros compostos, como antocianinas, carotenóides e compostos fenólicos, que impedem a formação de ERO ou eliminam as já existentes. Há algum tempo, tem sido verificada em plantas a presença de óxido nítrico (NO), radical livre endógeno que possui a capacidade de controlar o nível e a toxicidade das ERO. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o possível efeito citoprotetor do NO em plantas de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) expostas à RUV-B. Assim, foi realizado um primeiro experimento no qual plantas de eucalipto foram expostas à RUV-B em baixa (controle) e elevada incidência, com o intuito de verificar se a radiação promove estresse oxidativo nesta espécie. Foram

realizadas coletas de lâminas foliares aos cinco, dez e quinze dias após o início da exposição à RUV-B para posterior determinação do nível de peroxidação lipídica. A exposição por 15 dias à RUV-B aumentou os teores de lipoperóxidos nas mudas de eucalipto devido à ocorrência do estresse oxidativo. De acordo com esse resultado foi conduzido um segundo experimento no qual plantas de eucalipto foram pulverizadas com nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO, em doses parceladas por 3 dias consecutivos, totalizando 120 μmol L^{-1}, enquanto as plantas controle receberam tratamento com água, seguido pela exposição à RUV-B em baixa e alta incidência por 15 dias. Foram coletadas folhas aos sete e quinze dias após o início da exposição à RUV-B e realizadas determinações das atividades das enzimas SOD e POD, dos teores de compostos fenólicos e de antocianinas e a quantificação de indicadores de estresse oxidativo, como teores de lipoperóxidos e de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenóides). A RUV-B promoveu aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD e POD, no nível de peroxidação lipídica e nos teores de pigmentos fotossintéticos. O tratamento das mudas de eucalipto com SNP promoveu aumento dos teores de antocianinas e de carotenóides e também interagiu com a RUV-B elevando o teor de compostos fenólicos e atenuando o nível de peroxidação lipídica. Portanto a utilização de NO na eucaliptocultura pode ser considerada uma maneira de redução do estresse oxidativo gerado pela exposição à RUV-B.

INTERACTION BETWEEN ULTRAVIOLET-B RADIATION STRESS AND NITRIC OXIDE IN EUCALYPTUS PLANTS. Botucatu, 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
Author: NATÁLIA CORNIANI
Advisor: ANA CATARINA CATANEO
Co-advisor: INÊS CECHIN

2. SUMMARY

The species of the genus *Eucalyptus* present notable capacity to extract water and nutrients, photosynthetic assimilation and growth, allowing cultivation in ambient considered inappropriate for many other species. Besides the environmental factors acting adversely in the performance of the plants, nowadays they are subject to the effects of the global environmental changes caused by human activities, such as the increase in the incidence of the ultraviolet-B radiation (UV-B) in consequence of the ozone layer destruction. Recent studies show that UV- B radiation promotes increase in the level of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress in plants. However, plants have a defence system against oxidative stress, constituted of antioxidant enzymes, such as, superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), and others compounds, such as anthocyanins, carotenoids and phenolic compounds, that avoid ROS formation or eliminate the already existent. There has been long, it was noticed the presence of nitric oxide (NO) in plants, endogenous free radical able to control the ROS level and toxicity. Therefore, the aim of this work was to investigate the possible citoprotector effect of the NO in eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*) plants subjected to UV-B radiation. So, a first experiment was setup in which plants of eucalyptus were subjected to radiation in low (control) and high incidence of UV-B, to verify if UV-B radiation promotes oxidative stress in this specie. Leaves were collected at five, ten and fifteen days after the beginning of exposure to UV-B for subsequent evaluation of the level of lipid peroxidation. Exposure for 15 days to RUV-B increased the

lipoperoxide content in the eucalyptus seedlings due to the occurrence of oxidative stress. According to this result it was setup a second experiment in which plants of eucalyptus were sprayed with sodium nitroprusside (SNP), NO donor , for three consecutive days, totaling 120 μmol L^{-1} , while the control plants were sprayed with water, followed by exposure to UV-B radiation in low and high incidence. Leaves were collected at seven and fifteen days after the beginning of exposure to UV-B and accomplished determinations of the activities of the enzymes SOD and POD, of phenolic compounds content, of anthocyanins and the quantification of oxidative stress indicators, as lipoperoxides content and photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoids) were done. UV-B induced increase in the activity of the antioxidant enzymes SOD and POD, in the level of lipid peroxidation and in photosynthetic pigment contents. The treatment of the eucalyptus seedlings with SNP promoted increase in the content of anthocyanins and carotenoids. Furthermore, NO interacted with UV-B as a consequence it increased the phenolic compounds content and alleviated lipid peroxidation. Therefore, the use of NO in the eucalyptus culture can be considered as a way of alleviating the oxidative stress generated by the exposure to UV-B radiation.

Keywords: superoxide dismutase, peroxidase, lipoperoxides, photosynthetic pigments, phenolic compounds, anthocyanins, *Eucalyptus urograndis*.

3. INTRODUÇÃO

As árvores possuem um papel fundamental no ambiente terrestre, fornecendo matéria prima e ajudando na conservação de inúmeros recursos naturais que são essenciais à vida. A madeira, material encontrado unicamente nos vegetais superiores, constitui-se no quinto maior produto comercial do mundo devido sua enorme gama de utilizações, como por exemplo, produção de combustível, papel e celulose, construção civil e muitos outros. Além de seu alto valor econômico não se pode negar os efeitos ambientais da utilização das florestas plantadas, como por exemplo o seqüestro de carbono, reduzindo o efeito estufa e até mesmo a contribuição estética das árvores à paisagem natural (LI et al., 2006).

Dentre as espécies fornecedoras de madeira, as de *Eucalyptus*, árvores tropicais de extraordinário crescimento, merecem grande destaque por apresentarem excelente potencial para produção de madeira em função de sua diversidade, adaptabilidade, alta produtividade e características físico-mecânicas que permitem serem utilizadas para diversos fins (GONZÁLEZ et al., 2002).

Sob condições de campo, as plantas estão freqüentemente expostas a inúmeras variáveis ambientais que podem atuar adversamente em seu desempenho. Atualmente as plantas também estão sujeitas aos efeitos das mudanças ambientais globais causadas pelas atividades antrópicas, tais como o aumento na incidência da radiação

ultravioleta (RUV) em conseqüência da destruição da camada de ozônio. A radiação ultravioleta tem sido considerada potencialmente geradora de estresse oxidativo em plantas, principalmente na faixa de 280-320 nm, o que corresponde à radiação tipo UV-B (RUV-B) (BLUMTHALER & AMBACK, 1990). A redução da camada de ozônio conduziu a um conseqüente aumento desse tipo de radiação sobre a superfície terrestre (SAHAI et al., 2000).

O estresse oxidativo é gerado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) (STRATMANN, 2003). Fatores como herbicidas, poluição ambiental, estresse hídrico ou salino, além de radiação, causam aumento de ERO (FOYER et al., 1997; PRASAD et al., 1999; TSUGANE et al., 1999; GEOFFROY et al., 2002; MITTLER, 2002). Quando presente em quantidades relativamente baixas, as ERO e especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra estresse (LEVINE et al., 1994; LOW & MÉRIDA, 1996), porém, quando em quantidades mais elevadas causam severa injúria, decorrente da desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento de íons, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (DODGE, 1994). As plantas apresentam um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, constituído de enzimas antioxidantes, tais como, superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) e peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), bem como de compostos com atividade antioxidante podendo-se citar carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos que, de modo geral, metabolizam as ERO formadas sob situações de estresse (NOCTOR & FOYER, 1998; SELOTE et al., 2004).

Nos últimos anos tem sido investigado o potencial de alguns compostos químicos, por exemplo, o óxido nítrico (NO), na proteção de plantas expostas a fatores de estresse de natureza biótica e/ou abiótica. O NO é um radical livre endógeno formado numa variedade de tipos celulares e pode ser considerado, entre outras funções, como um citoprotetor (BELIGNI & LAMATTINA, 1999c). A citoproteção está baseada na capacidade do NO em regular o nível e a toxicidade das ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Assim, o NO pode exercer ação protetora contra o estresse oxidativo provocado pelo aumento da concentração de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e peróxidos alquilas (WINK et al., 1995).

O objetivo do presente trabalho foi investigar o possível efeito protetor do NO contra o estresse oxidativo em plantas de eucalipto expostas à RUV-B. Neste sentido é de extrema importância a determinação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD) e

(POD), bem como a quantificação dos teores de compostos fenólicos totais e antocianinas. Além da determinação destes parâmetros bioquímicos, a quantificação dos teores de lipoperóxidos e de pigmentos fotossintéticos constituem-se em um importante meio de detecção do nível de estresse oxidativo gerado nas plantas.

Assim, este trabalho pode fornecer informações sobre a possibilidade da utilização do NO em eucalipto, ainda na fase de produção de mudas em estufa, anteriormente ao plantio no campo, como medida preventiva contra o estresse oxidativo induzido pela RUV-B. Além disso, esta pesquisa básica pode servir como subsídio para pesquisas relacionadas ao melhoramento genético convencional, na biotecnologia e em estudos de identificação de resistência desta espécie florestal à RUV-B.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A cultura de *Eucalyptus*

4.1.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero foi denominado *Eucalyptus* por L'Heritier em 1788. Esta palavra deriva do grego: *eu* (= bem) e *kalipto* (= cobrir), em alusão a estrutura globular arredondada de seu fruto que protege as sementes até que estejam totalmente desenvolvidas (GUENTHER, 1977). O eucalipto possui como centro de origem a Austrália, onde cobre praticamente 90% da área do país, e regiões próximas como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné e sul das Filipinas (PRYOR et al., 1995).

Pertencente à família Myrtaceae, que concentra elementos voláteis nas folhas, contém cerca de 100 gêneros distribuídos por todos os continentes, com exceção da Antártida e com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e Austrália, o gênero *Eucalyptus* engloba cerca de 700 espécies além de muitas subespécies e híbridos naturais, que podem ser encontrados desde a forma arbustiva até árvores de grande porte. Apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (SANTOS et al., 2001).

Pryor & Johnson (1971), dividiram o gênero *Eucalyptus* em 7 subgêneros: *Corymbia, Blakella, Eudesmia, Ganbaea, Idiogenes, Monocalyptus e Symphyomyrtus*. Recentemente, *Corymbia* e *Blakella* foram formalmente separados em um novo gênero denominado *Corymbia*.

As espécies do gênero *Eucalyptus* são monóicas e apresentam ampla faixa de padrões de cruzamento, desde autofecundação causada por cleistogamia, até fecundação cruzada obrigatória, devido à autoincompatibilidade, macho esterilidade ou esterilidade feminina (GONZÁLEZ et al., 2002). A polinização é principalmente entomofílica e as abelhas (*Apis mellifera* L.) são os principais polinizadores, podendo ocorrer também a polinização pelo vento e por pássaros (SAMPSON et al., 1995).

O gênero *Eucalyptus* é utilizado como matéria-prima na produção de celulose, papel, chapa de fibras, madeira serrada, móveis, painéis e óleos essenciais. Outras vantagens adicionais são a proteção do solo contra erosões, capacidade de captação de CO_2, geração de energia (carvão e lenha), tanino (curtimento do couro) e mel (visando a polinização). Com isso, o *Eucalyptus* pode ser uma fonte de riqueza econômica e social, gerando empregos diretos e indiretos (SILVA, 2005).

4.1.2 Histórico

Historiadores mencionam que, por volta de 1774, o eucalipto foi introduzido na Europa por Antônio Guichenot e, em 1788, foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L'Héritier de Brutelle, no Sertum Anglicum, em Paris, valendo-se do material recolhido em expedições no território australiano. Até a metade do século XIX o eucalipto figurou apenas em coleções de alguns jardins botânicos, sem nenhuma importância comercial. Na Índia, os primeiros plantios ocorreram em 1843 e, por volta de 1856, já havia plantações de eucaliptos bem desenvolvidas. Os primeiros ensaios na Europa visando à produção comercial datam de 1854, principalmente com *Eucalyptus globulus*, plantado em Portugal pelo Barão de Massarellos e por J. M. Eugênio de Almeida. Em 1863 foi introduzido na Espanha e em 1869 na Itália (O EUCALIPTO, 2001).

Na América do Sul, o Chile provavelmente foi o primeiro país a introduzir o eucalipto em 1823, recebendo as sementes de um navio inglês. A Argentina teria introduzido o eucalipto em seu país em 1865, através do Presidente Garcia Moreno e no Uruguai, as primeiras sementes de eucalipto foram recebidas em 1853. É difícil se determinar, com segurança, a data de introdução do eucalipto no Brasil. Acredita-se que os exemplares mais antigos encontrados no país sejam de *Eucalyptus robusta* e *Eucalyptus tereticornis*, plantados pelo Imperador D. Pedro I no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em 1825 (O EUCALIPTO, 2001). No Rio Grande do Sul, as primeiras mudas foram plantadas em 1868, por Frederico de Albuquerque (FERREIRA & SANTOS, 1997) e, no mesmo ano, também foram plantados alguns exemplares na Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. Até o princípio do século XX, o eucalipto foi plantado para fins ornamentais e também para uso como quebra-vento. Com o objetivo de realizar pesquisas, o eucalipto foi introduzido sistematicamente no Brasil em 1903 por Edmundo Navarro de Andrade, que trabalhava na Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Ele iniciou o cultivo e o estudo de espécies de eucalipto visando utilizar a madeira para alimentar as caldeiras das locomotivas, produzir moirões para ferrovias e postes para eletrificação e também introduziu um número extraordinário de espécies no Horto Florestal de Rio Claro, constituindo um dos mais completos bancos de germoplasma do país (LIMA, 1993).

No Brasil o eucalipto foi adotado gradativamente como espécie alternativa para o suprimento de madeira, principalmente como combustível nas formas de lenha e carvão, em função do escasseamento das matas nativas. Até 1966, as estimativas são de uma área total plantada de, aproximadamente, 400 mil hectares. Neste período o governo federal estabeleceu o programa de incentivos fiscais, a fim de atender a crescente demanda de uma incipiente, porém agressiva indústria baseada na utilização de madeira como matéria-prima, principalmente nas regiões sul e sudeste, as quais já estavam naquela época, completamente destituídas de cobertura florestal natural. Em 1973, a área total plantada no país tinha ultrapassado a cifra de 1 milhão de hectares, a maior área plantada com eucalipto em todo o mundo, mais do que o dobro da área plantada pelo segundo colocado, a Índia (FAO, 2008).

4.1.3 Importância econômica

Estimativas da área global reflorestada com eucalipto apontam para 18 milhões de hectares (ha). Há grandes áreas de plantio na Ásia tropical, concentradas principalmente na Índia, com cerca de 8 milhões de ha, como também na América do Sul, com aproximadamente 10 milhões de ha. A estatística é dominada pelo Brasil, onde há aproximadamente 3,7 milhões de ha reflorestados com eucalipto (ABRAF, 2008). Além disso, plantios expressivos são encontrados em países de clima temperado, incluindo China, Chile, África do Sul, Portugal e Espanha.

No Brasil, o eucalipto tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais, por diversas razões: pela grande plasticidade do gênero, devido à diversidade de espécies adaptadas a diferentes condições de clima e solo; pela elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa; pelas características silviculturais desejáveis, como rápido crescimento e produtividade; em função do melhoramento genético e pela adequação aos mais diferentes usos industriais, com ampla aceitação no mercado (SILVA, 2005).

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

E. urophylla e *E. grandis* são espécies de maior interesse para a eucaliptocultura no Brasil, sendo utilizadas para a fabricação de celulose, chapas duras, produção de carvão e outros fins. O *E. urophylla* possui ampla capacidade de adaptação a diversas condições de ambientes tropicais, aliada à tolerância ao patógeno *Cyphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto (SANTOS et al., 1990). Já o *E. grandis* pode

alcançar produções de 50-60 m^3 ha^{-1} ano em condições favoráveis; tem idade de colheita menor e está adaptado ao clima quente e úmido (MURO-ABAD, 2001). Estas duas espécies foram utilizadas para a constituição do híbrido interespecífico *E. urograndis*, possibilitando a união das características mais desejáveis de ambas as espécies. Assim, este híbrido passou a ser o mais cultivado no território nacional (ABRAF, 2008).

O eucalipto é cultivado para os mais diversos fins, tais como produção de papel, celulose, lenha, carvão, aglomerado, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento. Há potencial uso do sistema agroflorestal para garantir melhor aproveitamento das áreas utilizadas na produção de eucalipto com outras diferentes culturas, a exemplo de soja, feijão, mandioca e amendoim, além de pastagens. De acordo com o anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2008) a área com eucalipto das suas associadas, por segmento industrial, em 2007 foi 72% para indústria de papel e celulose, 22% para siderurgia e 5% para painéis reconstituídos.

A área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil em 2007 foi de 3.751.867 ha representando um crescimento de 202.719 ha em relação ao ano de 2006. Desse total, o Estado de Minas Gerais contribui com 1.105.961 ha, seguido do Estado de São Paulo com 813.372 ha e do Estado da Bahia com 550.127 ha (Figura 1). O sistema agroindustrial florestal no segmento de florestas plantadas em 2007 gerou aproximadamente 4,6 milhões de empregos diretos e indiretos. A exportação de produtos derivados de florestas plantadas em 2007 somou US$ 6,1 bilhões, dos quais 70% foram resultantes do cultivo de eucalipto (ABRAF, 2008).

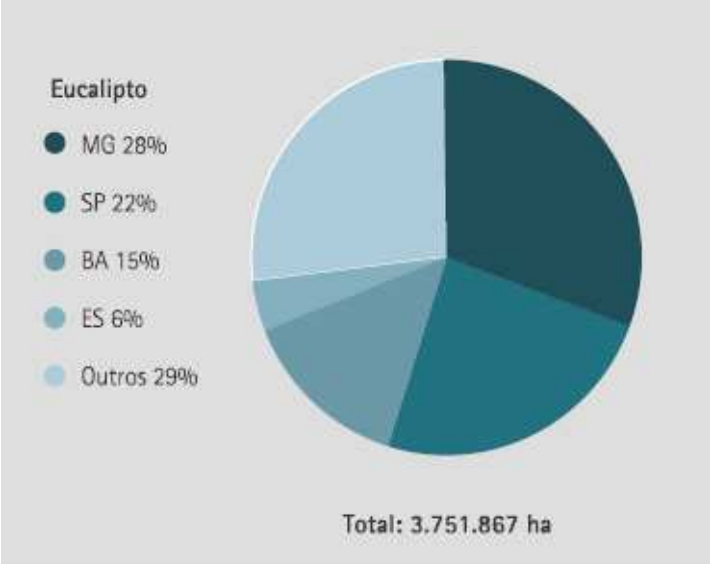

Figura 1 - Distribuição das florestas plantadas de eucalipto por Estados em 2007 (ABRAF, 2008).

4.2 Radiação ultravioleta-B

Todos os componentes da biosfera estão expostos à radiação ultravioleta-B (RUV-B) sob intensidades que variam conforme o ângulo solar e a espessura da camada de ozônio no local onde se encontram (JANSEN et al., 1998).

A camada estratosférica de ozônio é o principal agente atenuador da radiação ultravioleta na atmosfera terrestre e a redução desta camada, resultante da ação antrópica, conduziu a um conseqüente aumento da RUV-B (280-320 nm) incidente sobre a superfície terrestre (BLUMTHALER & AMBACK, 1990, ZIEMKE et al., 2000). Durante as últimas décadas a comunidade científica e a população em geral têm demonstrado considerável preocupação acerca da redução da camada de ozônio (YAO & LIU, 2006). Há abundantes evidências sobre a contínua destruição desta camada em várias partes do mundo, especialmente no pólo Sul. Alguns autores, nos anos 90, chamaram atenção para a possibilidade do buraco na camada de ozônio da Antártida causar perturbações em latitudes mais baixas. As primeiras evidências desta possibilidade foram apresentadas por Atkinson et al. (1989) para Austrália e Nova Zelândia. Pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas

Espaciais (INPE) observaram redução desta camada no Sul do Brasil (Santa Maria-RS; 29°S) em outubro de 1993, sendo que esta teve origem na Antártida e devido à capacidade de movimentação da massa de ar pobre em ozônio da região polar para outras regiões, causou perturbações em baixas latitudes (KIRCHHOFF et al., 1996). Posteriormente, pesquisadores do INPE observaram redução de 3,5% na camada de ozônio durante o período de 1990-1997 quando comparada ao período de 1974-1979 em Cachoeira Paulista-SP, 22,7^{o}S (SAHAI et al., 2000). Como conseqüência, os seres vivos das regiões afetadas por esta destruição estão sob os danos causados pelo aumento na intensidade da RUV-B que atinge a superfície terrestre (BLUMTHALER & AMBACK, 1990; ALEXIEVA et al., 2001).

O impacto da RUV-B no crescimento, desenvolvimento, acúmulo de biomassa e metabolismo dos vegetais tem sido tema de estudos de vários grupos de pesquisa, revelando considerável variação intra e interespecífica na sensibilidade à RUV-B (KRUPA & KICKERT, 1993; ROZEMA et al., 1997; DECKMYN & IMPENS, 1999; TEVINI, 1999). Algumas espécies não são afetadas pela radiação supra citada enquanto outras, aparentemente, têm, por exemplo, sua taxa fotossintética aumentada (JOHNSON & DAY, 2002). Esta sensibilidade diferencial é parcialmente explicada pela habilidade das espécies em responder à RUV-B por meio da indução de mecanismos de defesa juntamente com aumento na concentração de pigmentos e compostos protetores (TEVINI, 1999; HIDEMA et al., 2001) e também é influenciada pelo regime hídrico e estado nutricional (BALAKUMAR et al., 1997; MARK & TEVINI, 1997).

Estudos têm mostrado que a RUV-B promove aumento no nível de ERO presentes em baixa concentração sob condições normais de crescimento, ocasionando estresse oxidativo (YAO & LIU, 2006; AGARWAL & SHAHEEN, 2007; CECHIN et al., 2008).

4.3 O Estresse Oxidativo em Plantas

As plantas, dada sua característica de seres sésseis, estão expostas a uma grande variedade de estresses ambientais que alteram seu metabolismo e desenvolvimento, exibindo uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular

(FLOWERS et al., 2000; ZHU, 2001). Uma alteração metabólica importante para as plantas em condições de estresse é o aumento da produção de ERO (APEL & HIRT, 2004; FOYER & NOCTOR, 2005).

O oxigênio molecular (O_2) é pouco reativo, mas tem capacidade de originar estados intermediários excitados e altamente reativos durante sua redução a H_2O, sendo estes estados representados pelas ERO (SCANDALIOS, 1993). As principais formas de ERO são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). A aceitação de excesso de energia pela molécula de O_2 pode levar adicionalmente a formação do oxigênio singleto ($^1O_2$), uma molécula altamente reativa que possui meia-vida de aproximadamente 4-6 µs na água e 100 µs em ambientes não-polares, podendo assim transferir sua energia de excitação para outras moléculas biológicas ou reagir com elas formando então hidroperóxidos ou endoperóxidos, respectivamente (VRANOVÁ et al., 2002; OP DEN CAMP et al., 2003).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é um radical livre moderadamente reativo, com meia-vida de aproximadamente 2-4 µs. No entanto, esse radical não pode atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a H_2O_2. Caso essa reação não ocorra, o radical superóxido pode reduzir quinonas e complexos metálicos de transição de Fe^{3+} e Cu^{2+}, afetando portanto, a atividade de metaloenzimas. Os radicais hidroperoxilas (HO_2^-), que são formados a partir da protonoção do $O_2^{\bullet-}$ em soluções aquosas, podem atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos polinsaturados e de hidroperóxidos de lipídios iniciando então, a peroxidação lipídica (NEILL et al., 2002).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é moderadamente reativo, possui uma vida celular relativamente longa e pode atravessar distâncias consideráveis a partir de seu local de produção (VRANOVÁ et al., 2002), e também tem capacidade de difundir-se livremente através das aquaporinas (HENZLER & STEUDLE, 2000). Tais características fazem desta ERO um importante sinalizador intracelular, tendo um papel central em várias vias (FOYER & NOCTOR, 2003). Entre os processos induzidos pelo H_2O_2 estão a formação de ligações transversas na parede celular, o fechamento estomático, a expressão de genes relacionados a uma grande variedade de respostas ambientais e a indução da atividade de enzimas antioxidantes como catalase e peroxidases (NEILL et al., 2002).

A mais reativa das ERO é o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) formado a partir de H_2O_2 pelas reações de Haber-Weiss e de Fenton (Figura 2), com a utilização de catalisadores metálicos como o Fe^{+2} (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 1989; CHANDRU et al., 2003). Este radical pode reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas. Como as células não possuem mecanismos enzimáticos para eliminar essa espécie altamente reativa, a sua produção em excesso leva, por fim, a morte celular (VRANOVÁ et al., 2002).

Sequência da Reação de Fenton

$$O_2^- + Fe^{3+} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$$

Reação de Haber-Weiss

$$H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$$

Figura 2 – Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss.

Sob condições normais de crescimento, as plantas apresentam baixa produção celular de ERO as quais são provenientes, dentre outras fontes, de processos ocorrentes nos cloroplastos e da respiração mitocondrial (DOUDICAN et al., 2005). Nessas condições podem agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (LEVINE et al., 1994; LOW & MÉRIDA, 1996). Portanto, as ERO podem ser vistas tanto como indicadores celulares de estresse como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Quantidades mais elevadas de ERO ocasionam o estresse oxidativo caracterizado por severas injúrias, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, modificações protéicas, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (MOLLER et al., 2007). A produção e os efeitos de ERO não são necessariamente

delimitados dentro do mesmo compartimento celular. Além disso, fontes distintas parecem ser responsáveis pela produção de ERO sob as diferentes condições de estresse (SMIRNOFF, 1993; BELIGNI & LAMATTINA, 1999a). Não obstante, situações como extremos hídricos, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos, estresse mecânico, baixa disponibilidade de nutrientes, aleloquímicos, altas temperaturas, bem como ataque de patógenos podem induzir aumento da produção de ERO, promovendo a quebra da homeostase celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; MALAN et al., 1990; ELSTERN, 1991; GILLE & SIGLER, 1995; FOYER et al., 1997; PRASAD & RENGEL, 1998; PRASAD et al., 1999; TSUGANE et al., 1999; GEOFFROY et al., 2002; MITTLER, 2002; PINHEIRO et al., 2002).

A produção contínua de ERO, conseqüência inevitável de processos metabólicos aeróbios como respiração e fotossíntese, gerou a necessidade de evolução dos sistemas de proteção a fim de minimizar os efeitos fitotóxicos dessas espécies dentro da célula (APEL & HIRT, 2004).

4.4 Mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo

Apesar das plantas utilizarem os níveis de ERO para o monitoramento de seu estado intracelular de estresse, este deve ser mantido sob um fino controle devido aos efeitos devastadores decorrentes do acúmulo dessas espécies (MITTLER, 2002; MOLLER et al., 2007). Para que este acúmulo seja evitado, as plantas possuem um sistema natural de defesa antioxidante constituído por componentes de natureza enzimática e não-enzimática muito eficientes que permitem a eliminação de ERO e a conseqüente proteção contra danos oxidativos (BLOKHINA et al., 2003).

Antioxidantes não enzimáticos são representados pelas formas hidrossolúveis, como ascorbato e glutationa, e lipossolúveis, como α-tocoferol e carotenóides. Compostos fenólicos também eliminam radicais superóxido e hidroxila, além de oxigênio singleto (APEL & HIRT, 2004). Dentre os compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, destacam-se os flavonóides que quimicamente, englobam as antocianinas e os flavonóis. As antocianinas são pigmentos solúveis em água, amplamente difundidas no reino

vegetal e conferem as várias nuances de cores entre laranja, vermelha e azul encontradas em frutos, vegetais, flores, folhas e raízes (FRANCIS, 1989).

Dentre os antioxidantes de natureza enzimática figuram as superóxido dismutases, as peroxidases, a catalase e a glutationa redutase (MISRA & GUPTA, 2006; SUN et al., 2007). Como o estresse oxidativo compreende uma complexa série de fenômenos, o aumento simultâneo em diversos componentes do sistema de defesa antioxidante se faz necessário a fim de se obter maior tolerância ao estresse (RADETSKI et al., 2000).

4.5 Enzimas Antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante das plantas inclui diversas enzimas localizadas nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas pode-se destacar as superóxido dismutases e as peroxidases que, juntamente com outras enzimas promovem a eliminação de ERO (HERNÁNDEZ et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2004). O grau de estresse oxidativo em uma célula é determinado pela quantidade de peróxido de hidrogênio e de radicais superóxido e hidroxila. Portanto, o balanço das atividades da superóxido dismutase e da peroxidase é crucial na supressão dos níveis tóxicos de ERO nas células (APEL & HIRT, 2004).

4.5.1 Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Segundo Alscher et al. (2002), as SOD constituem a primeira linha de defesa contra as ERO dentro da célula. Estas proteínas pertencem ao grupo das metaloenzimas responsáveis pela desintoxicação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), catalisando sua dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (Figura 3) (VAN BREUSEGEM et al., 2001). A dismutação é vital para proteger as células da injúria oxidativa, visto que o $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com o H_2O_2 para formar radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) que é altamente reativo. Entretanto, o H_2O_2 é um subproduto tóxico do metabolismo oxidativo e é posteriormente convertido ou utilizado

pelas peroxidases (BARTOSZ, 1997; SCANDALIOS, 1993).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Figura 3 - Esquema da ação da enzima SOD na eliminação de ERO.

A SOD é uma enzima ubíqua, sendo amplamente distribuída entre organismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos e obrigatórios. Três tipos distintos de SODs foram observados numa grande variedade de organismos, diferindo no tipo de íon metálico presente no sítio ativo (SCANDALIOS, 1993). Deste modo, existem formas que contêm cobre e zinco (Cu/ZnSOD), manganês (MnSOD) ou ferro (FeSOD). As enzimas Fe-SODs estão presentes nos cloroplastos, enquanto que as Mn-SODs na matriz mitocondrial. As Cu/Zn SODs são normalmente encontradas no citosol e possivelmente no espaço extracelular, sendo que algumas plantas contêm uma isoforma nos cloroplastos (TSANG et al., 1991; ALSCHER et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2004). O número e o tipo de isoformas de SOD é variável entre as espécies vegetais, bem como a abundância relativa de cada isoforma (ASADA, 1999).

Na tentativa de eliminação dos radicais superóxido formados sob condições de adversidade, as plantas apresentam mecanismos de defesa por meio do aumento de atividade da SOD, correlacionando-se ao aumento da tolerância ao estresse (TSANG et al., 1991; SCANDALIOS, 1993). Alterações na atividade da SOD têm sido verificadas em plantas sob diferentes condições de estresse, incluindo o estresse oxidativo pela exposição à radiação UV-B (BALAKUMAR et al., 1997; AGARWAL, 2007; SELVAKUMAR, 2008). A SOD também tem sido associada à resposta das plantas sob diferentes tipos de estresses como salino (BOR et al., 2003), nutricional (YU et al, 1998), hídrico (BAISAK et al., 1994), poluentes ambientais como ozônio e dióxido de enxofre (SCANDALIOS, 1993) e aplicação de herbicidas (CATANEO et al., 2005; FERREIRA, 2007; REMAEH, 2008).

4.5.2 Peroxidases (POD, EC 1.11.1.7)

As POD encontram-se amplamente distribuída entre os vegetais nos quais se apresentam em uma variedade de isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (CAMPA, 1991). Desempenham importante papel na biossíntese da parede celular, funções no crescimento, no processo de diferenciação e no desenvolvimento celular, bem como na oxidação do ácido indol acético e do etileno, além de estarem envolvidas nas respostas ao estresse (BEWLEY & BLACK, 1994).

Estas enzimas são consideradas as mais importantes na eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (Figura 4) (INZÉ & VAN MONTAGU, 1995). De acordo com Siegel (1993), a atividade das POD é freqüentemente aumentada em resposta ao estresse, pois a proteção celular contra reações oxidativas é uma das principais funções dessa enzima. Isto se deve ao fato das PODs decomporem o H_2O_2 produzido nas reações catalisadas pela SOD (BOR et al., 2003).

As peroxidases funcionam como uma espécie de termômetro geral das atividades fisiológicas das plantas, pois sua atividade é altamente influenciada pelas condições externas (MENEZES et al., 2004). Gaspar et al. (1986) afirmaram que as peroxidases parecem ser a molécula chave na adaptação das plantas, ou de algum de seus órgãos separadamente, às mudanças do meio ambiente.

O aumento de atividade das PODs é uma resposta metabólica relacionada a diferentes tipos de estresses (ZHANG & KIRKHAM, 1996; JIMÉNEZ et al., 1998). A indução da atividade da peroxidase foi detectada em folhas de batata expostas à RUV-B (SANTOS et al., 2004).

$$\text{Agente Redutor} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{POD}} \text{Produto Oxidado} + H_2O$$

Figura 4 - Esquema da ação da enzima POD na eliminação de ERO.

4.6 Indicadores de Estresse Oxidativo

Há diversos indicadores bioquímicos que refletem o nível de injúrias celulares resultantes do estresse oxidativo, os quais permitem a confirmação da existência ou não da quebra da homeostase celular em decorrência da exposição a estresses bióticos e/ou abióticos. Dentre os indicadores mais amplamente utilizados figuram os teores de lipoperóxidos e de pigmentos fotossintéticos.

4.6.1 Lipoperóxidos

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final de século XIX (LORRAIN-SMITH, 1899), tornando-se objeto de intensa investigação científica (HALLIWELL, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente ácidos graxos poliinsaturados, mediada pelas ERO (ROMERO et al., 1998). A reação das ERO com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliada e utilizada como indicadora do nível de estresse oxidativo celular (VERMA & DUBEY, 2003).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de ERO sobre os lípidios insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações das cadeias de DNA, entre outros (BABER & HARRIS, 1994).

Aumento dos teores de lipoperóxidos foi relatado em plantas submetidas a estresse hídrico severo (BAISAK et al., 1994), altas temperaturas (BECANA et al., 2000), radiação UV-B (MALANGA & PUNTARULO, 1995) e toxidez por cádmio e zinco (PRASAD et al., 1999; SHAH et al., 2001). Pesquisas verificaram que metais como

cobre, níquel, alumínio e cádmio induziram a peroxidação de lipídios em *Silene cucubalus* (DE VOS et al., 1989), soja (CAKMAK & HORST, 1991), trigo (PANDOLFINI et al., 1992) e feijão (SOMASHEKARIAH et al., 1992).

A formação de lipoperóxidos é iniciada com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular (Figura 5). Tal seqüestro pode ser realizado pelo radical hidroxila (OH*) ou pelo radical alcoxila (LO*), com conseqüente formação do radical lipídico (L*). Na primeira equação de propagação, o L* reage rapidamente com o O_2, resultando em radical peroxila (LOO*) que, por sua vez, seqüestra novo H do LH, formando novamente o L* na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais L* e LOO*, produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até destruírem a si próprios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

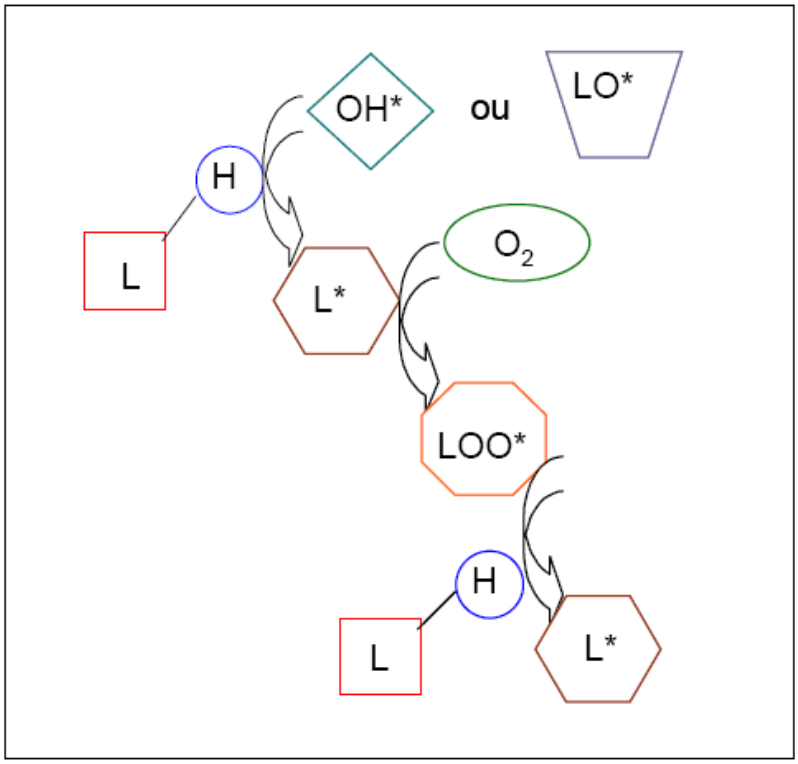

Figura 5 - Esquema da sequência de reações ocorrentes na peroxidação lipídica.

4.6.2 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) são essenciais ao desenvolvimento das plantas, pois são responsáveis pela captura da energia solar incidente usada na fotossíntese (BLACKBURN, 1998).

As clorofilas correspondem a um grupo de pigmentos verdes absorventes de luz e ativos na fotossíntese. Todas as clorofilas têm uma complexa estrutura em anel que é quimicamente relacionada aos grupos porfirinas encontrados na hemoglobina e nos citocromos. Há, quase sempre, uma longa cauda de hidrocarbonetos ligada à estrutura do anel (TAIZ & ZEIGER, 2004). A clorofila *a* é mais sensível a fotodegradação do que outros pigmentos fotossintéticos (RONTANI, 2001).

Os carotenóides encontram-se entre os pigmentos naturais mais abundantes e ocorrem em bactérias fotossintéticas e não fotossintéticas, algas, fungos, plantas, pássaros, insetos, crustáceos e peixes. A maior parte apresenta estrutura linear C_{40} com ligações duplas conjugadas. O termo caroteno designa um carotenóide constituído somente por hidrogênio e carbono. Já a xantofila refere-se ao carotenóide que apresenta um ou mais grupos funcionais contendo oxigênio. O número de ligações duplas determina a propriedade espectral que o carotenóide terá. Geralmente os carotenóides absorvem luz na faixa entre 400 - 600 nm (JUNIOR, 2002). Nas plantas apresentam relevante papel na fotossíntese por realizarem três importantes funções: a) absorvem a luz em comprimentos de onda compreendidos entre 400 e 550 nm e transferem-na às clorofilas, desempenhando papel acessório na captação luminosa; b) protegem o aparato fotossintético por extinguirem radicais livres prejudiciais que são naturalmente formados durante a fotossíntese, apresentando assim função antioxidante; c) são importantes para a estruturação do fotossistema I e para a estabilidade das proteínas que constituem os complexos coletores de luz, bem como para a estabilização das membranas dos tilacóides, tendo desta forma uma função estrutural (TREBST & DEPKA, 1997; SUJAK et al., 1999; NIYOGI et al., 2001; KIM et al., 2004).

De acordo com Sangtarash et al. (2009) a exposição à RUV-B pode promover aumento, redução ou nenhum efeito no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Alexieva et al. (2001) verificaram em plantas de ervilha e trigo que o tratamento com RUV-B reduziu o conteúdo de clorofila. Hofmann et al. (2003) trabalhando com *Trifolium repens*

verificaram aumento de 4% no conteúdo de clorofila em plantas hidratadas expostas à RUV-B, enquanto que aquelas submetidas somente a deficiência hídrica apresentaram decréscimo de 16% nos níveis do pigmento.

4.7 Óxido Nítrico

Por mais de 50 anos, a única molécula de sinalização conhecida pela ciência era o hormônio vegetal etileno. Em 1998, o Prêmio Nobel de Medicina anunciou o estabelecimento de outra molécula, até mesmo menor, desempenhando essa função em células de mamíferos - o óxido nítrico (NO) (WOJTASZEK, 2000).

O NO é uma das menores moléculas diatômicas com elevada difusibilidade (4,8 x 10^{-5} cm^2 s^{-1} em H_2O), exibindo propriedades hidrofóbicas. Assim, pode não somente migrar facilmente pelas regiões hidrofílicas da célula, tal como o citoplasma, mas também difundir-se livremente pela fase lipídica das membranas (ARASIMOWICZ & WIECZOREK, 2007). Estima-se que a meia-vida do NO em tecidos biológicos seja menor que seis segundos, o que reflete sua natureza altamente reativa (THOMAS et al., 2001; BETHKE et al., 2004).

Extensivas pesquisas sobre o papel do NO em animais têm demonstrado seu papel chave na sinalização, participando de uma ampla variedade de processos fisiológicos. Pode-se citar seu papel como importante neurotransmissor, atuando na memória; sua ação na imunorregulação, presente nos mecanismos de autoimunidade; além de atuar no relaxamento dos vasos sanguíneos e do músculo liso nos sistemas cardiovascular, bronco-pulmonar e renal (ZILBERSTEIN & FLORA, 2000; KOPYRA & GWÓZDZ, 2003). Assim, devido ao fato de o NO ser um potente agente em processos biológicos, uma renovada atenção tem sido dada aos mecanismos de sua síntese em plantas (BETHKE et al., 2004).

Em animais, o NO é sintetizado via óxido nítrico sintase (NOS) que também apresenta atividade em plantas (CUETO et al., 1996). Entretanto, a produção de NO nas plantas não se restringe a atividade da NOS, podendo este ser gerado pela atividade da nitrito redutase (NiR) e nitrato redutase (NR), enzima dependente de NAD(P)H (LESHEM, 1996; YAMASAKI et al., 1999). A NR é considerada como fonte endógena desta molécula

(YAMASAKI & SAKIHAMA, 2000). São descritos nos organismos vegetais mecanismos não enzimáticos de geração de NO, como a redução apoplástica de nitrito (NO_2^-) (BETHKE et al., 2004) e por ação dos carotenóides em pH ácido ou em presença de luz (COONEY et al., 1994).

Embora as funções fisiológicas do NO em plantas ainda não tenham sido totalmente esclarecidas, evidencia-se sua participação em vários processos fisiológicos, como na regulação do crescimento (BELIGNI & LAMATTINA, 2000, 2001); ativação de respostas de defesa contra ataque de patógenos (DURNER et al., 1998; BOLWELL, 1999); diferenciação celular (FERRER & ROS BARCELO, 1999); acúmulo de fitoalexinas (NORITAKE et al., 1996); germinação (BELIGNI & LAMATTINA, 2000; NEILL et al., 2003) e superação de dormência em sementes (BETHKE et al., 2006); organogênese radicular (PAGNUSSAT et al., 2002) e apoptose/morte celular programada (BELIGNI et al., 2002).

Embora pesquisas relacionadas aos efeitos do NO nos vegetais sejam relativamente recentes, constata-se que esta molécula, mesmo apresentando estrutura molecular bastante simples, encontra-se envolvida em diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos em plantas submetidas a múltiplas condições de estresses bióticos e abióticos (FERREIRA, 2007).

Assim, o NO pode impedir fenômenos fisiológicos e bioquímicos atribuídos as ERO por meio do controle do nível e da toxicidade das mesmas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984). Desta forma, o NO pode atuar como antioxidante em plantas por neutralizar a vazão de íons e a fragmentação de DNA, decorrentes da ação de ERO (KOPYRA & GWÓZDZ, 2003) e por interromper as reações propagadas em cadeia que promovem a peroxidação lipídica (RUBBO et al., 1994).

O NO também exerce função na neutralização do estresse oxidativo induzido pelo ácido abscísico (HUNG & KAO, 2003); metil jasmonato (HUANG et al., 2004); excesso de cádmio (HSU & KAO, 2004); salinidade (ZHAO et al., 2007) e a toxidez das ERO geradas pela exposição à RUV-B (SHI et al., 2005; ZHANG et al., 2009).

Deve-se mencionar que os efeitos do NO sobre os diferentes tipos de células podem ser tanto citoprotetores quanto citotóxicos, de acordo com sua concentração (BELIGNI & LAMATTINA, 1999a). Os efeitos citoprotetores do NO em plantas foram relatados sob fortes condições oxidativas durante estresses bióticos e abióticos (BELIGNI &

LAMATTINA, 1999b, 1999c, 2002). Segundo Wink et al. (1995), a citoproteção contra dano oxidativo é claramente observada em diferentes níveis de organização, tais como cultura celular, tecido, órgão e planta inteira, podendo ser exercida sobre todas as macromoléculas testadas: DNA, RNA, proteínas, clorofilas e lipídios.

A citotoxicidade mediada pelo NO é principalmente gerada por este reagir prontamente com o radical superóxido ($O_2^{-\bullet}$), levando à formação do forte oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$), que em pH fisiológico é instável. Porém, devido à sua meia-vida relativamente longa, de aproximadamente um segundo, o $ONOO^-$ pode difundir-se a consideráveis distâncias na célula, reagindo com grupos tiol das proteínas e com radicais poliinsaturados dos ácidos graxos dos lipídios de membrana, resultando na diminuição da atividade de enzimas e em sérios danos às estruturas celulares, respectivamente. Além disso, os ânions $ONOO^-$ podem protonar-se, formando o ácido peroxo-dioxonítrico, uma fonte de dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($OH^\bullet$) (VAN BREUSEGEM et al., 2001; ARASIMOWICZ & WIECZOREK, 2007).

Doadores de óxidos nitrogenados são compostos que produzem NO quando aplicados a sistemas biológicos e que são capazes de imitar uma resposta relacionada ao NO endógeno ou substituir o NO endógeno quando deficiente. As vias que levam à formação de NO diferem-se amplamente entre os vários grupos de compostos, alguns dos quais requerem catálise enzimática, enquanto outros o produzem não-enzimaticamente (WIECZOREK et al., 2006).

Os complexos NO-metais de transição representam uma importante classe de doadores de NO. O mais comumente usado é o nitroprussiato de sódio (SNP), que atua como um poderoso ligante, em que o nitrogênio liga-se ao metal em maior proporção do que o oxigênio. O mecanismo de liberação do NO a partir do SNP não está claro, embora seja conhecido e usado na terapia clínica por mais de 70 anos. A solução de SNP é extremamente fotossensível e sua degradação pode ser promovida pelo oxigênio e por elevada temperatura (WANG et al., 2002; WIECZOREK et al., 2006).

Assim como os hormônios vegetais, o efeito do NO é dependente de sua concentração. Desse modo, concentrações muito elevadas do doador podem promover inibição de um determinado processo, de modo que os resultados obtidos não refletirão a ação do NO endógeno na célula. As concentrações de doador comumente aplicadas variam de 10 a

500 μmol L^{-1}, embora existam relatos de concentrações muito maiores, no máximo iguais a 10 mmol L^{-1} (MODOLO et al., 2002; WIECZOREK et al., 2006).

5. MATERIAL E MÉTODOS

A execução deste trabalho foi realizada em duas etapas, o que permitiu o alcance do objetivo proposto. As etapas foram planejadas de modo que a execução da segunda etapa dependeu dos resultados obtidos na anterior.

5.1 Experimento I

5.1.1 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e Horticultura, Departamento de Ciências Biológicas, FC/ UNESP/Bauru-SP, no mês de abril de 2008 (Figura 6). Foram utilizadas mudas clonais de eucalipto híbrido das espécies *E. grandis x E. urophylla*, denominado *Eucalyptus urograndis*, cedidas pela empresa Duratex S/A, Lençóis Paulista-SP. As mudas foram mantidas em tubetes cilindro-cônicos de polietileno com volume de 50 cm^3, preenchidos por substrato previamente adubado com níveis adequados de macro e micronutrientes, sob condições fotoperiódicas naturais durante o período experimental. A temperatura máxima e mínima foi de 32°C e 21°C, respectivamente.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 4 repetições, em esquema fatorial 2 x 3 (tratamentos de radiação x épocas de coleta).

Figura 6 - Vista externa da casa de vegetação – FC/UNESP/Bauru.

5.1.2 Tratamentos

Como fonte de RUV-B foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 40 W (UVB-313, Q-Panel Co., Cleveland, OH, USA) fixadas em 2 estruturas de alumínio, com sistema de roldanas para regular a distância entre as lâmpadas e o ápice das plantas, dispostas acima de duas bancadas (0,80 m de largura x 4,5 m de comprimento) que foram separadas com cortina de poliéster para impedir a passagem lateral de RUV-B para as plantas controle. Sobre cada bancada havia 7 pares de lâmpadas, distribuídas a cada 50 cm (Figura 7). As lâmpadas que irradiaram as plantas controle foram envoltas com filtro de poliéster (0,125 mm de espessura; Du Pont Co., USA) para bloquear comprimentos de onda (λ) menores que 320 nm, enquanto aquelas sobre a bancada contendo as plantas submetidas à maior incidência de RUV-B foram envoltas com acetato de celulose (0,10 mm de espessura; Málaga Produtos Metalizados Ltda., BR) para bloquear a radiação UV-C ($\lambda < 280$ nm). Estes filtros foram trocados a cada 8 e 4 dias, respectivamente, para evitar o efeito da fotodegradação causado

pela RUV-B. Para medir a radiação incidente sobre as plantas foi utilizado um medidor de voltagem (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., BR) conectado a um sensor de RUV-B com amplificador (Delta-T Devices Limited, UK). A distância entre as lâmpadas e o topo das plantas foi mantida constante através do sistema de roldanas. A radiação média de RUV-B incidindo no topo das plantas foi de aproximadamente 7 W m^{-2} e 1,7 W m^{-2} para plantas tratadas (alta incidência) e controle (baixa incidência), respectivamente. As plantas foram irradiadas com RUV-B por 7 h dia^{-1} centralizadas ao redor do meio dia, por quinze dias.

Figura 7 - Sistema de lâmpadas (vista lateral) sobre as bancadas da casa de vegetação.

5.1.3 Quantificação dos teores de lipoperóxidos

Para obtenção das amostras, foram coletadas lâminas foliares das plantas controle e expostas à RUV-B suplementar aos cinco, dez e quinze dias após o início dos tratamentos.

Padronizou-se como amostragem o segundo par de folhas sentido basípeto. Cada amostra coletada correspondeu a duas lâminas foliares, as quais foram mantidas em baixa temperatura para que seu metabolismo não sofresse alterações significativas. As amostras foram pesadas e embaladas em plástico e papel alumínio, devidamente etiquetadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80°C.

Para a quantificação dos teores de lipoperóxidos foi utilizada a técnica descrita por Heath & Packer (1968), citados por Rama Devi & Prasad (1998). Esta técnica permite quantificar lipoperóxidos através da determinação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação de lipídios.

As amostras de lâminas foliares, foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria (90°C) por 60 minutos, seguido de resfriamento em gelo. O homogeneizado resfriado foi então centrifugado em 10000*g* por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 e 600 nm (Figura 8). O coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 mmol L^{-1} cm^{-1}) foi utilizado para o cálculo dos teores de lipoperóxidos. Os resultados foram expressos em nmol de lipoperóxidos g^{-1} tecido fresco.

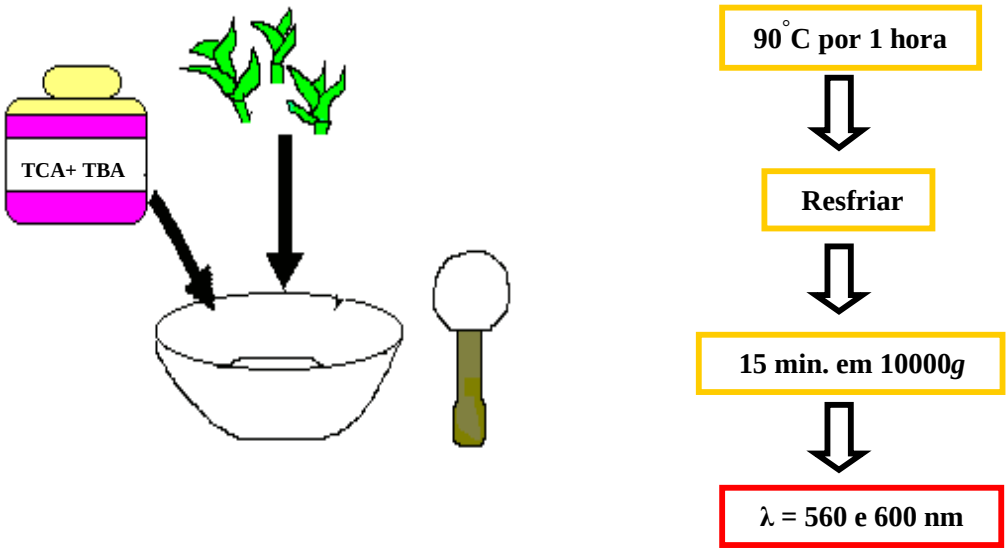

Figura 8 - Esquema de quantificação dos teores de lipoperóxidos.

5.2 Experimento II

5.2.1 Material vegetal e delineamento experimental

Foram utilizadas mudas clonais do híbrido *Eucalyptus urograndis*, cedidas pela empresa Duratex S/A, Lençóis Paulista-SP, com 60 dias, desenvolvidas em casa de vegetação sombreada, ou seja, sem exposição direta a radiação solar, não ocorrendo desta forma a rustificação das mesmas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e Horticultura do Departamento de Ciências Biológicas, FC/UNESP/Bauru-SP, no período de setembro a outubro de 2008. As mudas foram mantidas em tubetes cilindro-cônicos de polietileno com volume de 50 cm^3, preenchidos por substrato adubado com macro e micronutrientes, sob condições fotoperiódicas naturais durante o período experimental. As mudas foram regadas diariamente, com água de torneira, de acordo com a necessidade hídrica e suplementadas com 50 mL de solução de N:P:K (19:6:20) acrescida de micronutrientes (condutividade = 2) uma vez por semana. A temperatura máxima e mínima foi de 29°C e 18°C, respectivamente.

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados, com 4 repetições, em esquema fatorial 2 x 2 x 2 (tratamentos de radiação x doses de nitroprussiato de sódio (SNP) x épocas de coleta). As doses de SNP, utilizado como doador de NO, foram equivalentes a 0 e 120 μmol L^{-1}. As épocas de coletas corresponderam aos 7 e 15 dias após o início da exposição das plantas à RUV-B.

5.2.2 Tratamentos

O tratamento com radiação UV-B está descrito no subitem 5.1.2.

As mudas de eucalipto receberam doses fracionadas de SNP, 40 μmol L^{-1}, por 3 dias consecutivos, a um intervalo de 24 h, totalizando 120 μmol L^{-1}, de acordo com Remaeh (2008) (Tabela 1). Aquelas não tratadas com SNP receberam aplicações de água de torneira. Para as aplicações, utilizou-se um pulverizador manual com capacidade de 2 L e com vazão de bico em torno de 6,4 mL s^{-1}. Após 24 h da última aplicação de SNP (4° dia), iniciou-se a exposição das mudas à RUV-B. Nos tubetes das mudas que receberam SNP foi colocada fita adesiva amarela para diferir do controle (Figura 9). Os tratamentos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1 - Dias de aplicação das doses de nitroprussiato de sódio (SNP) ou água e início da exposição à RUV-B, em plantas de eucalipto.

Dias	SNP	Controle	RUV-B
1º	40 μmol L^{-1}	água	
2º	40 μmol L^{-1}	água	
3º	40 μmol L^{-1}	água	
4º	----------	---------	Início da exposição
Total	**120 μmol L^{-1}**		

Figura 9 - Tubetes com plantas de eucalipto, sem e com fita adesiva amarela, correspondendo aos tratamentos controle e com aplicações de SNP, respectivamente.

Tabela 2 - Diferentes tratamentos de RUV-B e SNP aplicados em plantas de eucalipto.

	SNP	**RUV-B**	**Tratamentos**
1	-------	-------	– NO – UV-B
2	120 μmol L^{-1}	-------	+ NO – UV-B
3	-------	+	– NO + UV-B
4	120 μmol L^{-1}	+	+ NO + UV-B

5.2.3 Avaliações bioquímicas

5.2.3.1 Obtenção das amostras

Nas duas coletas , aos 7 e 15 dias após o início da exposição à RUV-B, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no subitem 5.1.3.1. Para a determinação dos teores de compostos fenólicos e de antocianinas foram coletadas amostras de lâminas foliares, as quais foram secas em estufa a 70°C por 48 h e trituradas em moinho.

5.2.3.2 Quantificação dos teores de compostos fenólicos e antocianinas

A extração de compostos fenólicos e de antocianinas foi realizada por meio da técnica descrita por Musil et al. (2003). Amostras foliares previamente secas em estufa e finamente trituradas em moinho, foram dispostas em frascos contendo 6 mL de solução de $MeOH:H_2O:HCl$ (79:20:1) mantidos na ausência de luz por 48 h. Após este período, os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro e utilizados para medida de absorbância em espectrofotômetro a 280, 300, 310, 530 e 657 nm. A concentração de compostos fenólicos foi expressa pela absorbância dividida pelo peso da matéria seca ($A_{280, 300, 310}$ mg^{-1}) e o teor de antocianinas pela fórmula ($A_{530} - 1/3A_{657}$)/peso da matéria seca (LINDOO & CALDWELL, 1978).

5.2.3.3 Quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos utilizando-se o método de Arnon (1949). Amostras de lâminas foliares foram homogeneizadas em almofariz contendo acetona 80% e em seguida os homogeneizados obtidos foram transferidos para tubos de centrífuga e centrifugados por 5 minutos a 7000 rpm. O volume do sobrenadante foi completado para 15 mL com acetona 80% e realizadas medidas de absorbância nos comprimentos de onda de 470, 647 e 663 nm. Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas

totais e de carotenóides totais foram calculados através das fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em mg de pigmento g^{-1} de matéria fresca.

5.2.3.4 Quantificação dos teores de lipoperóxidos

Foi realizado de acordo com o subitem 5.1.3.

5.2.3.5 Obtenção dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram obtidos conforme o procedimento descrito por Ekler et al. (1993) (Figura 10). O material vegetal foi homogeneizado em 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl 0,2 mol L^{-1} pH 7,8 contendo 1 mmol L^{-1} de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 7,5% (peso volume^{-1}) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), em almofariz gelado, contendo uma pequena quantidade de areia previamente lavada e esterilizada. O homogeneizado foi filtrado em tecido organza e posteriormente centrifugado a 14.000*g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido de cada amostra foi coletado e armazenado em *freezer* a -20°C para posterior determinação da atividade das enzimas SOD e POD, bem como dos teores de proteínas solúveis.

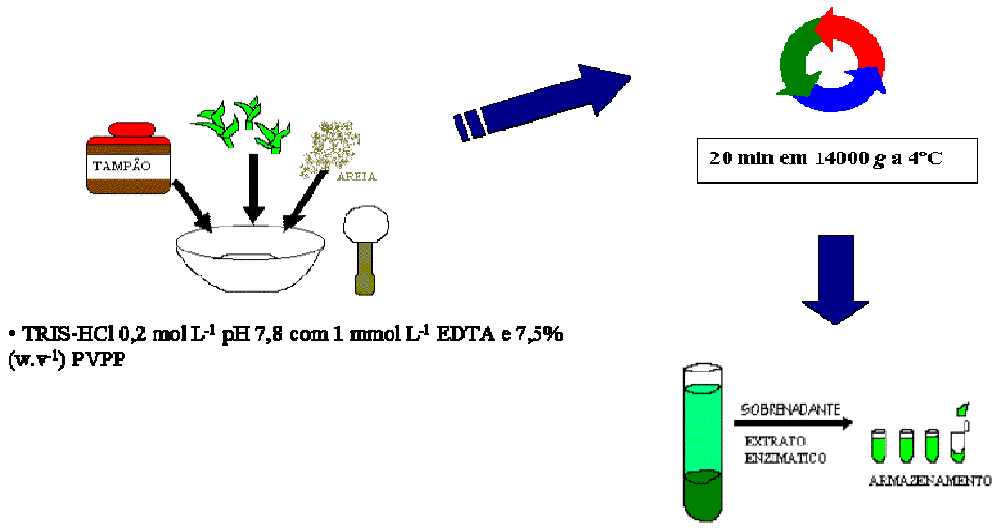

Figura 10 - Esquema da extração enzimática.

5.2.3.6 Atividade da pirogalol peroxidase (PG-POD, EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade da PG-POD foi realizada por meio da técnica descrita por Teisseire & Guy (2000).

O sistema de reação constitui-se de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} pH 6,5, pirogalol 20 mmol L^{-1} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol L^{-1}, totalizando volume final de 1 mL. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos. A mudança na absorbância devido à formação da purpurogalina foi medida em espectrofotômetro a 430 nm (Figura 11). O coeficiente de extinção molar da purpurogalina (2,5 mmol L^{-1} cm^{-1}) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em mmol de purpurogalina min^{-1} mg^{-1} de proteína.

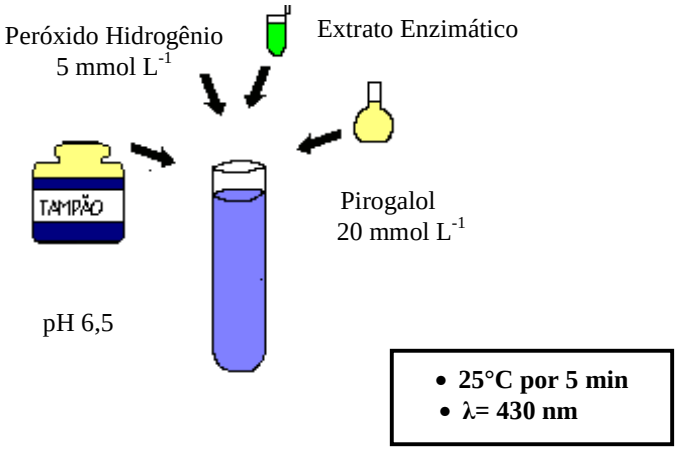

Figura 11 - Esquema da técnica para determinação da atividade da PG-POD.

5.2.3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método de Beauchamp & Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). A técnica é baseada na capacidade da enzima em converter radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2).

O sistema de reação foi constituído de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 7,8, mistura 'nitroblue tetrazolium' (NBT) 33 μmol L^{-1} com EDTA 0,66 mmol L^{-1} (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol L^{-1} com riboflavina 0,0033 mmol L^{-1} (1:1), totalizando um volume de 3 mL.

Esse sistema foi mantido em temperatura ambiente e sob iluminação por 10 minutos, utilizando lâmpada fluorescente, enquanto outros sistemas preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos na ausência de luz (utilizados como branco). A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (λ = 560 nm) em ambos os sistemas (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que consistiu na inibição da redução do NBT em 'blue formazan' pela dismutação enzimática do radical superóxido (Figura 12).

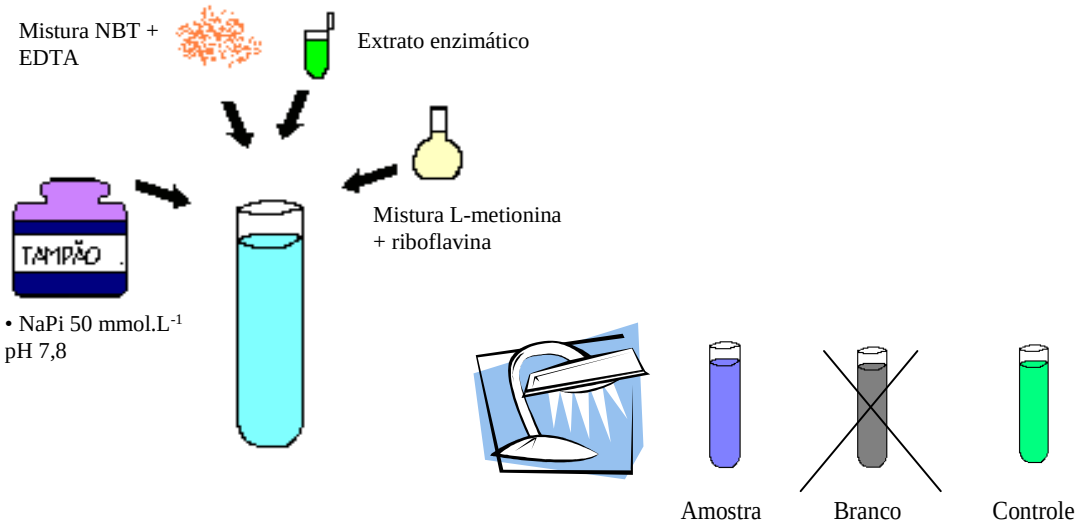

Figura 12 - Esquema da técnica da determinação da atividade da superóxido dismutase.

A riboflavina em meio alcalino gera fluxo de radicais superóxido (O_2^-), que converte o NBT ('nitroblue tetrazolium') em 'blue-formazan' (Figura 13). Esta conversão é inibida pela SOD. A velocidade da redução do NBT na ausência do extrato enzimático foi utilizada como controle.

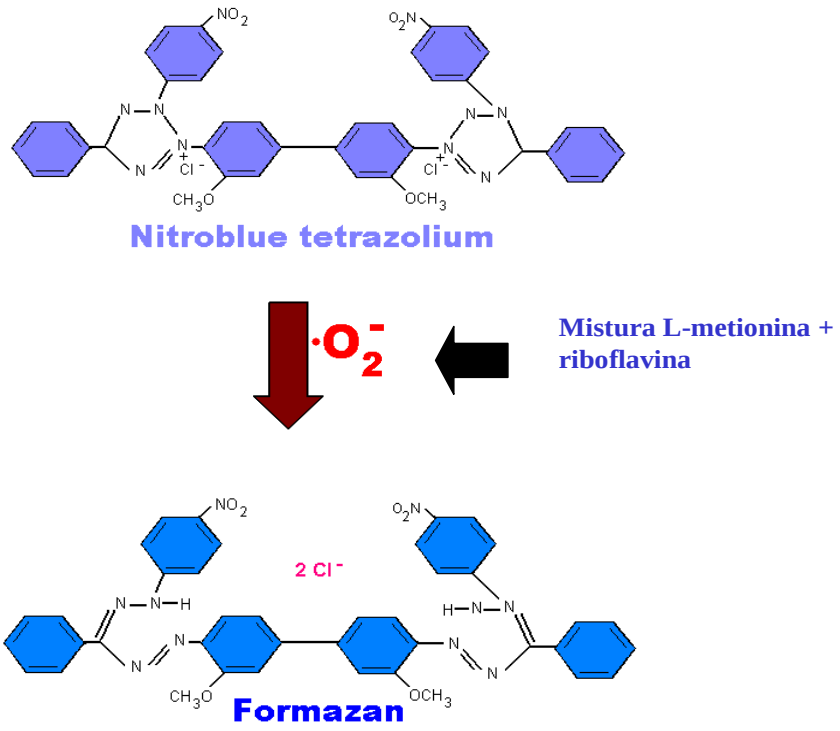

Figura 13 - Conversão do NBT a "blue formazan", promovida pelos radicais superóxido.

Uma unidade enzimática (U) de atividade da SOD expressa em U mg^{-1} de proteína, foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução do NBT.

5.2.3.8 Quantificação dos teores de proteínas solúveis

Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos, cuja quantificação é necessária para o cálculo da atividade específica das enzimas estudadas, foram obtidos pelo método de Bradford (1976) (Figura 14). Leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando-se caseína como proteína de referência.

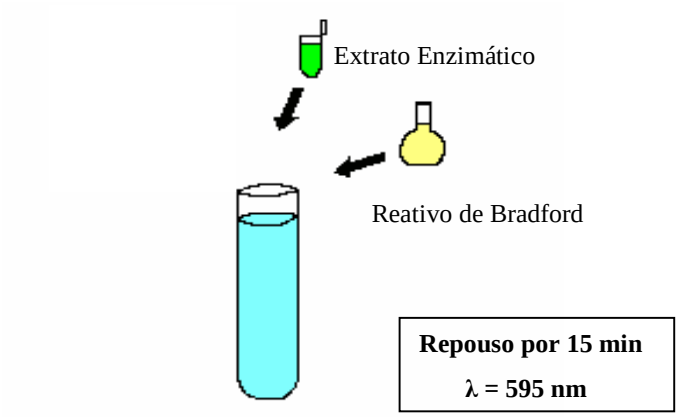

Figura 14 - Esquema da quantificação de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos.

5.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do uso do software Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 9.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os dados obtidos nos dois experimentos foram submetidos à análise de variância fatorial. No primeiro experimento foram testados os efeitos individuais da radiação ultravioleta-B e das coletas assim como da interação entre eles; com os dados do segundo experimento realizou-se os mesmos procedimentos descritos incluindo os efeitos do óxido nítrico. Nas análises, 4 plantas de cada tratamento foram utilizadas como repetições (n = 4).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura são escassos os relatos de trabalhos que relacionem óxido nítrico, radiação ultravioleta-B e espécies florestais; assim, tornou-se necessário, a efeitos comparativos e ilustrativos, mencionar trabalhos realizados com espécies agrícolas expostas as mais diversas condições geradoras de estresses.

6.1 Experimento I

Diversas condições de estresses em plantas, dentre eles a exposição à RUV-B, podem promover aumento na produção de ERO acarretando estresse oxidativo (ALEXIEVA et al., 2001; HOFMANN et al., 2003). A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de ERO, é utilizado para se avaliar o nível de estresse oxidativo presente (VERMA & DUBEY, 2003). Malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, é utilizado como indicador da ocorrência de estresse em plantas. Apesar de existir muita controvérsia na literatura quanto sua especificidade, o MDA permanece como o indicador mais utilizado (ARMSTRONG & BROWNE, 1994).

No presente estudo a exposição de mudas de eucalipto à RUV-B desencadeou o processo lipoperoxidativo nas membranas foliares. Na Tabela 3 e Figura 15

pode-se observar aumento no teor de lipoperóxidos somente 15 dias após o início da exposição, apesar de haver uma tendência de aumento aos 10 dias.

Aumento nos teores de lipoperóxidos em decorrência do estresse por RUV-B foi observado por vários autores (DAI et al., 1997; MACKERNESS et al. 1998; COSTA et al., 2002; SELVAKUMAR, 2008; HAN et al., 2009), indicando que a RUV-B induz a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas pelo aumento na geração de ERO.

Tabela 3 - Comparação de médias e análise de variância do efeito da RUV-B nos teores de lipoperóxidos (MDA) em plantas de eucalipto aos 5, 10e 15 dias após a exposição (DAE) à RUV-B em baixa (-RUV-B) e elevada incidência (+RUV-B).

	5	10	15
	Teor de Lipoperóxidos (MDA)		
			23.15 ± 2.94
			35,93 ± 3,81
- RUV-B	18,34 ± 0,67	18,80 ± 0,82	
+RUV-B	17,30 ± 1,42	25,65 ± 3,87	
Tratamento	NS	NS	*

Valores são Média ± Erro de 4 repetições.

Níveis de significância: * P<0,05; NS (não significativo).

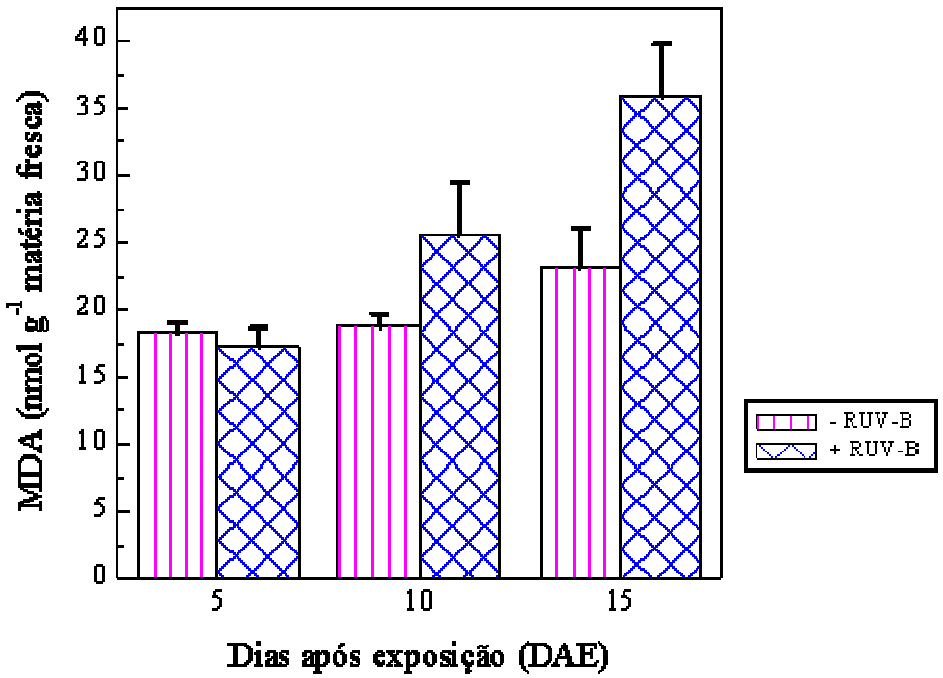

Figura 15 - Nível de peroxidação lipídica (teor de MDA) em plantas de eucalipto no período de 5, 10 e 15 dias após início da exposição à RUV-B em baixa (-RUV-B) e alta incidência (+RUV-B). Os resultados representam médias ± erro de 4 repetições.

Estes resultados indicaram que a RUV-B ocasionou estresse oxidativo em plantas de eucalipto de modo que se tornou válido verificar o possível efeito citoprotetor do óxido nítrico, objetivo da condução do segundo experimento.

6.2 Experimento II

Na análise estatística, as coletas realizadas aos 7 e 15 dias de exposição à RUV-B não apresentaram efeito significativo nas variáveis bioquímicas analisadas: atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e pirogalol peroxidase (PG-POD), nível de peroxidação de lipídios (MDA), concentração de pigmentos fotossintéticos, antocianinas e compostos fenólicos.

As plantas possuem diferentes sistemas de defesa contra os estresses ambientais (BOR et al., 2003), o que lhes permitem adaptação e minimização dos danos que podem ocorrer pela ação de ERO (RADETSKI et al., 2000). Para a verificação da ocorrência de estresse nas plantas é necessária a quantificação de indicadores desta condição. Existem diversos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo, dentre os quais, teores de lipoperóxidos e de pigmentos fotossintéticos, representados por clorofila *a*, *b* e total, bem como carotenóides. Nesse sentido, há estudos que demonstram elevação no nível de peroxidação lipídica, bem como a degradação de pigmentos fotossintéticos em diferentes espécies de plantas expostas à RUV-B, tais como em cotilédones de girassol (COSTA et al., 2002), em plantas de feijão (SHI et al., 2005), de *Cassia auriculata* L. (AGARWAL, 2007) e de *Picea asperata* (HAN et al., 2009).

Na Tabela 4 verifica-se que o efeito da RUV-B no nível de peroxidação lipídica foi altamente significativo. Porém, a interação com o NO resultou na amenização do seu efeito, com consequente redução no teor de lipoperóxidos (Figura 16).

Estudos indicam que a presença de NO protege a membrana lipoprotéica dos danos oxidativos (SUN et al., 2007). Tal proteção se deve ao fato de o NO interromper as reações em cadeia da peroxidação de lipídios, por interagir com os radicais lipídicos alcoxila ou peroxila formados no processo (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

Zhang et al. (2009) observaram que plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, com supressão do gene AtNOS1, com menor atividade da NOS e conseqüente redução no teor endógeno de NO, apresentaram teor de MDA maior que o das plantas controle quando expostas à RUV-B. Entretanto, o tratamento das plantas com SNP 100 μmol L^{-1}, antes da exposição à RUV-B, reduziu o teor de MDA, sendo o mesmo observado neste trabalho, utilizando plantas de eucalipto tratadas com SNP na concentração de 120 μmol L^{-1}.

Alterações no fluxo iônico refletem os danos causados às membranas como consequência do estresse oxidativo. Shi et al. (2005) verificaram que o fluxo iônico aumentou em folhas de feijão expostas à RUV-B. O tratamento com SNP 100 μmol L^{-1} reduziu significativamente o fluxo iônico observado, enquanto concentrações mais elevadas (200 e 500 μmol L^{-1}) não exerceram efeito protetor.

Tabela 4 - Análise de Variância Fatorial da aplicação de SNP e da RUV-B nos teores de lipoperóxidos (MDA) e de pigmentos fotossintéticos em plantas de eucalipto.

	Fator de Variação		
	RUV-B	NO	RUV-B *x* NO
MDA	**	NS	NS
Clorofila *a*	**	NS	NS
Clorofila *b*	**	NS	NS
Clorofila total	**	NS	NS
Carotenóides	*	*	NS

Níveis de significância: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0, 001; NS (não significativo).

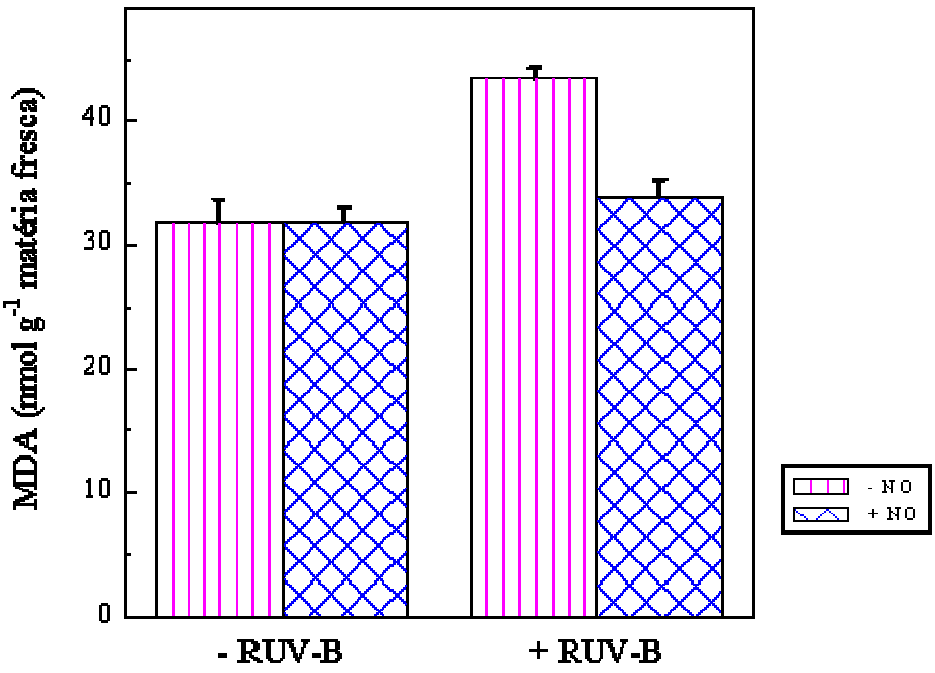

Figura 16 – Nível de peroxidação lipídica (teor de MDA) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições.

Observa-se na Tabela 4 e Figura 17 (a, b, c) que a RUV-B promoveu aumento nos teores das clorofilas. Diversos autores obtiveram resultados concordantes aos resultados do presente estudo, onde descreveram aumentos nos teores de clorofilas sob efeito da RUV-B (CALDWELL et al., 1982; TEVINI & TERAMURA 1989; MARK & TEVINI, 1997; BOEGER & POULSON, 2006). Entretanto, Kakani et al. (2003) observaram que as concentrações de clorofilas *a*, *b* e total foram menores nas folhas tratadas com RUV-B, para várias espécies estudadas, em função da ruptura dos tilacóides e a desintegração de suas membranas.

Segundo Boeger & Poulson (2006) os estudos que abordam a relação entre as concentrações de clorofila com RUV-B ainda são controversos. Alguns autores sugerem que plantas tratadas com RUV-B e que apresentaram maiores concentrações de clorofila parecem ser mais tolerantes à radiação (BORNMAN & VOGELMANN 1991; GREENBERG et al., 1997), enquanto outros consideram que as maiores concentrações de clorofila, juntamente com os compostos fenólicos, podem ser indicadores da resposta da planta à radiação, mas não um indicador de sensibilidade (SMITH et al., 2000).

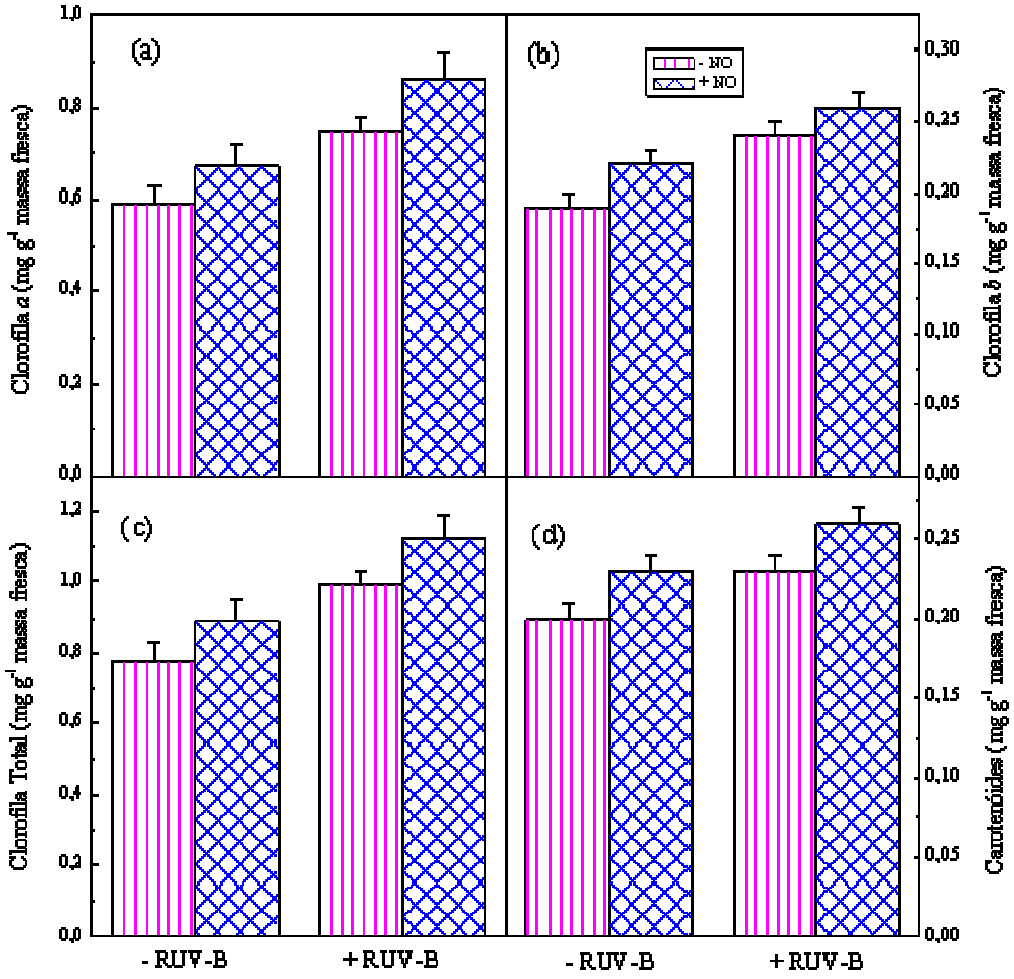

Figura 17 - Teores de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b), clorofila total (c), carotenóides (d) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições.

Os carotenóides, além de sua ação na fotossíntese, exercem função antioxidante nos cloroplastos devido sua capacidade de extinguir ERO, que são naturalmente formadas durante este processo (KIM et al., 2004). Na presença de luz os carotenóides também podem promover a síntese de NO endógeno nas plantas (COONEY et al., 1994).

A Tabela 4 e Figura 17d mostram os efeitos do NO e da RUV-B nos teores de carotenóides. Nota-se que tanto a RUV-B quanto o NO, isoladamente, apresentaram efeito promovendo aumento nos teores deste pigmento.

O aumento na concentração de carotenóides, resultante da exposição à RUV-B suplementar, protege as plantas dos efeitos deste estresse (LIU et al., 1995).

Sangtarash et al. (2009) observaram aumento na concentração de carotenóides em plantas de canola expostas à RUV-B e que o regime hídrico ao qual estavam expostas interferia na magnitude deste aumento, sendo maior em plantas bem hidratadas.

Han et al. (2009) observaram que plantas de *Picea asperata* cultivadas em temperatura ambiente apresentavam aumento nos teores de carotenóides quando expostas à RUV-B, porém, aquelas cultivadas em temperatura 1,7°C mais elevada apresentavam decréscimo na concentração deste pigmento quando expostas à radiação.

Alguns estudos relataramm efeito protetor do NO na degradação de carotenóides em plantas sob estresse pela aplicação de herbicidas. Em folhas de soja foi demonstrado que tratamentos com SNP (50, 100 e 200 μmol L^{-1}) promoveram aumento nos teores de carotenóides às 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação do herbicida lactofen (FERREIRA, 2007). Remaeh (2008) observou que o tratamento com doses fracionadas de SNP por 3 dias, totalizando 120 μmol L^{-1}, amenizou a degradação de carotenóides aos 5 dias após aplicação do herbicida oxyfluorfen em plantas de eucalipto.

O grau de dano que a RUV-B pode causar nas plantas depende da eficiência dos mecanismos de proteção e reparo, como o acúmulo de substâncias que absorvem a radiação, assim como, a ativação de defesas antioxidantes (JANSEN et al., 1998; MAZZA et al., 2000).

Adicionalmente, as plantas expostas à RUV-B são induzidas a alterações bioquímicas, tais como a produção de compostos que absorvem RUV-B, como os compostos fenólicos e antocianinas (DAY, 1993; MAZZA et al., 2000). Os compostos que absorvem a RUV-B atenuam seu efeito e reduzem assim significativamente seu potencial de danificar o DNA, que ocorre nas células do mesofilo (DAY, 1993; HOQUE & REMUS, 1999).

De acordo com Searles et al. (2001) muitas plantas são capazes de reduzir a penetração da RUV-B nas folhas através do incremento na concentração de

compostos fenólicos, sendo tal aumento interpretado como indicador de adaptação das plantas à RUV-B.

Com relação aos compostos fenólicos pode-se verificar na Tabela 5 e Figura 18a que a interação do NO com a RUV-B resultou em aumento nos teores de compostos fenólicos.

Não obstante, há inúmeros estudos que mencionam aumento destes compostos absorventes de radiação em diversas espécies expostas à RUV-B, como relatado em plantas de sorgo (AMBASHT & AGRAWAL, 1998), ervilha e trigo (ALEXIEVA et al., 2001), feijão (MEIJKAMP et al., 2001), soja (MAZZA et al., 2000) e *Arabidopsis thaliana* (BOEGER & POULSON, 2006).

Pode-se observar que dentre as plantas não expostas à RUV-B aquelas pulverizadas com SNP apresentaram menores teores de compostos fenólicos, em comparação as plantas controle, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa (Figura 18a). Estes resultados estão de acordo com Wu et al. (2007) que relataram redução dos teores de compostos fenólicos em raízes adventícias de *Echinacea purpurea* submetidas a doses de SNP superiores a 100 μmol L^{-1}.

Tabela 5 - Análise de Variância Fatorial da aplicação de SNP e da RUV-B nos teores de compostos fenólicos e de antocianinas em plantas de eucalipto.

	Fator de Variação		
	RUV-B	NO	RUV-B *x* NO
Fenólicos	NS	NS	*
Antocianinas	NS	*	NS

Níveis de significância: * P<0,05; NS (não significativo).

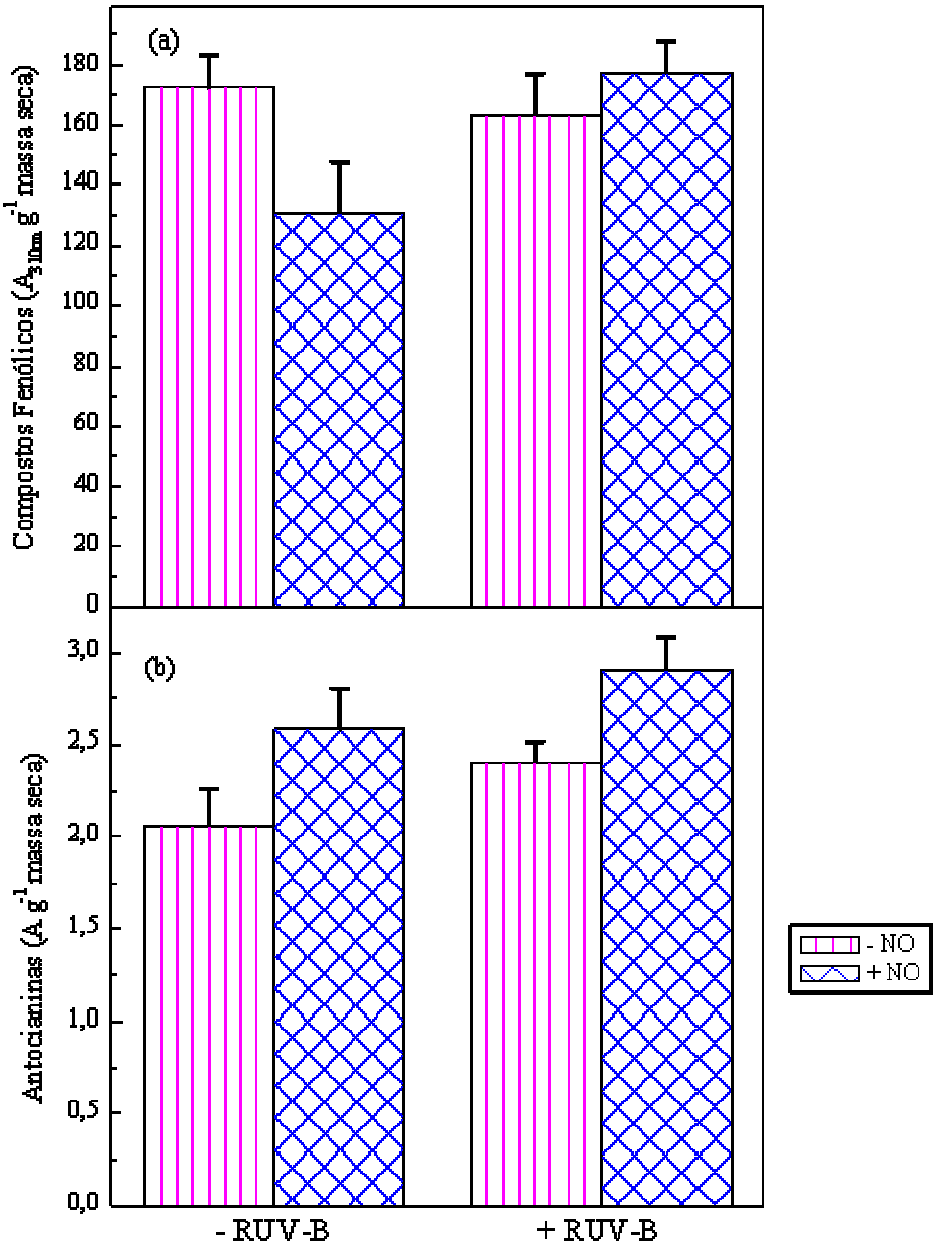

Figura 18 - Teores de compostos fenólicos (a) e de antocianinas (b) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições.

As antocianinas absorvem a RUV-B e assim reduzem os efeitos deletérios nos tecidos foliares (DAY & VOGELMANN, 1995). Segundo Balakumar et al. (1997) as antocianinas também exercem atividade antioxidante em plantas expostas as injúrias decorrentes do estresse oxidativo.

No presente trabalho foi detectada uma tendência de aumento da concentração de antocianinas promovido pela RUV-B (Tabela 5 e Figura 18b). Diversos trabalhos relataram aumento nos teores de antocianinas em plantas expostas a este tipo de radiação (DAY & VOGELMANN, 1995; BALAKUMAR et al., 1997; VEGA & PIZARRO, 2000; MEIJKAMP et al., 2001).

Na Tabela 5 e Figura 18b observa-se que houve aumento na concentração de antocianinas nas plantas de eucalipto tratadas com NO. Estes resultados concordam com os relatados por Zhang et al. (2009), que observaram aumento nos teores de antocianinas em plantas de *Arabidopsis* pulverizadas com SNP 100 μmol L^{-1}.

A fim de mitigar o estresse oxidativo, ocasionado pela elevada produção de ERO, as plantas desenvolveram um eficiente sistema antioxidante incluindo enzimas como SOD e POD (COSTA et al., 2002; WHITE & JAHNKE, 2002; APEL & HIRT, 2004; GONG et al., 2005). A utilização de antioxidantes exógenos também pode amenizar o estresse oxidativo e o SNP, doador de NO, está entre os produtos químicos mais eficientes na proteção das plantas sob condições de estresse (CHEN et al., 2003; MORLEY et al., 2003; LASPINA et al., 2005).

Assim, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e PG-POD foi determinada no presente trabalho, por desempenharem ação protetora contra situações de estresse como a exposição à RUV-B.

A SOD catalisa a dismutação de radicais superóxido ($O_2^{-\bullet}$) formados em plantas expostas a agentes oxidantes (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 1993).

Na Tabela 6 e Figura 19a pode-se observar que a exposição à RUV-B elevou a atividade da SOD, enquanto que o NO não apresentou efeito.

Diversos trabalhos relataram aumento de atividade da SOD em plantas expostas à RUV-B. Selvakumar (2008) constatou aumento em plantas de *Crotalaria juncea* e *Vigna unguiculata* e Han et al. (2009) em *Picea asperata*, sendo o aumento acentuado pela

elevação na temperatura ambiente. Entretanto, Costa et al. (2002) observaram diminuição da atividade da SOD em cotilédones de girassol expostos à RUV-B.

Apesar de o NO não ter efeito na atividade da SOD no presente estudo, Shi et al. (2005) observaram que o tratamento com SNP 100 μmol L^{-1} aumentou a atividade desta enzima em plantas de feijão expostas à RUV-B.

Tabela 6 - Análise de Variância Fatorial da aplicação de SNP e da RUV-B na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e pirogalol peroxidase (PG-POD) em plantas de eucalipto.

	Fator de Variação		
	RUV-B	NO	RUV-B *x* NO
SOD	**	NS	NS
PG-POD	***	NS	NS

Níveis de significância: ** P<0,01; *** P<0,001; NS (não significativo).

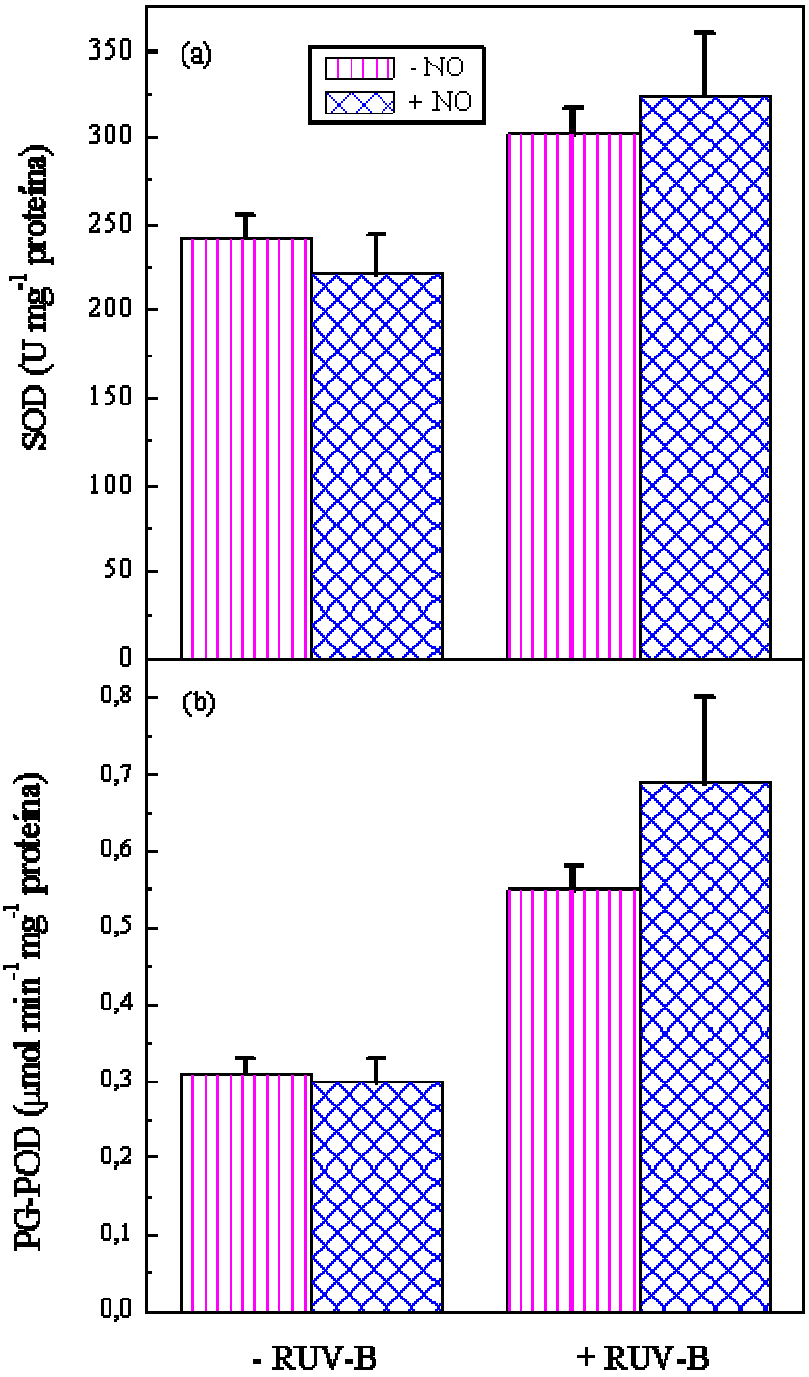

Figura 19 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) (a) e da pirogalol peroxidase (PG-POD) (b) em plantas de eucalipto sem aplicação de SNP (-NO) e com aplicação de SNP (+NO), expostas à baixa e alta incidência de RUV-B (-RUV-B, +RUV-B), respectivamente. Os resultados representam médias ± erro de 8 repetições.

As PODs apresentam função antioxidante nas células vegetais expostas a condições de estresse por decomporem o H_2O_2 produzido pela SOD (BOR et al., 2003). Assim, as peroxidases são isoenzimas associadas a mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas submetidas a estresses (GASPAR et al., 1986).

A exposição à RUV-B pode provocar um estímulo ou inibição das peroxidases (MEIJKAMP et al., 2001).

A atividade da PG-POD apresentou comportamento bastante semelhante ao observado em relação à SOD, ou seja, apenas a RUV-B promoveu aumento significativo da atividade da enzima (Tabela 6 e Figura 19b).

Aumento de atividade das peroxidases pela RUV-B tem sido observado em diversas espécies, tais como beterraba (Panagopoulos et al., 1990), pepino (Krizek et al., 1993), *Arabidopsis thaliana* (Rao et al., 1996), batata (Santos et al., 2004), *Mono maple* (Yao & Liu, 2006) e girassol (CECHIN et al., 2008). Santos et al. (2004) afirmaram que a alta atividade das peroxidases em plantas expostas à RUV-B, poderia indicar um grau mais elevado do metabolismo oxidativo nas células.

O efeito do NO na atividade das peroxidases também tem sido objeto de estudos (ARASIMOWICZ & WIECZOREK, 2007). Wang et al. (2008) relataram que a exposição de algas *Nostoc* sp. à RUV-B aumentou a atividade da POD porém, a aplicação de SNP 50 μmol L^{-1} a reduziu. Wu et al. (2007) observaram redução de atividade da enzima em raízes adventícias de *Echinacea purpurea* submetidas a várias concentrações de SNP (50, 100 e 250 μmol L^{-1}).

Nota-se que as mudas de eucalipto expostas à RUV-B e com aplicação de SNP 120 μmol L^{-1} apresentaram tendência a maior atividade da PG-POD quando comparadas com as não pulverizadas (Figura 19b).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que plantas de *Eucalyptus urograndis* são sensíveis à RUV-B e que a utilização de NO minimiza os efeitos deletérios deste estresse.

Entretanto, as respostas das plantas à RUV-B envolvem vários mecanismos fisiológicos que ainda necessitam ser elucidados. Os resultados apresentados mostraram as respostas desta espécie sob um tratamento de RUV-B e de SNP. Deste modo, outros experimentos utilizando outros níveis de RUV-B e outras concentrações de SNP,

podem gerar informações importantes acerca da ação citoprotetora do NO, bem como para o entendimento do desempenho de *Eucalyptus urograndis* sob condições simuladoras das alterações ambientais globais, como o aumento da RUV-B sobre a superfície terrestre.

7. CONCLUSÕES

Para as condições em que se desenvolveu a presente pesquisa, pode-se concluir que:

- ☑ a exposição à RUV-B ocasiona estresse oxidativo em mudas de eucalipto;

- ☑ o NO minimiza o estresse oxidativo gerado pela exposição à RUV-B atenuando o nível de peroxidação lipídica , não pela indução de enzimas antioxidantes (SOD e PG-POD), mas sim pelo aumento dos teores de carotenóides e compostos fenólicos e/ou por controlar diretamente o nível de ERO;

- ☑ a utilização de SNP na eucaliptocultura pode ser considerada como uma ferramenta para reduzir os danos decorrentes do estresse oxidativo ocasionado pela exposição de mudas à RUV-B e portanto,

- ☑ estudos mais avançados são necessários para verificar se os benefícios oriundos da aplicação de SNP em mudas se refletem na produção final.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas – **Anuário estatístico da ABRAF 2008**. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>. Acesso em: 10 nov. 2008.

AGARWAL, S. Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radition. **Biologia Plantarum**, v.51, p.157-160, 2007.

AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p.149-161, 2007.

ALEXIEVA, V. et al. The effect of drought and ultraviolet-B radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p.1337-1344, 2001.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N. HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany,** v.53, p.1331-1341, 2002.

[1] Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT – NBR-6023 – Informação e Documentação – Referências - Elaboração atualizada. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

AMBASHT, N.K.; AGRAWAL, M. Physiological and biochemical responses of *Sorgum vulgares* plants to supplemental ultraviolet-B radiation. **Canadian Journal of Botany**, v.76, p.1290-1294, 1998.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

ARASIMOWICZ, M.; WIECZOREK, J.F. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, v.172, p.876-887, 2007.

ARMSTRONG, D.; BROWNE, R. The analysis of free radicals, lipid peroxidases, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Free Radicals in Diagnostic Medicine**, v.366, 1994.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601-639, 1999.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, cap. 5, p.93-121.

ATKINSON, R.J. et al. Evidence of the midlatitude impact of Antartic ozone depletion. **Nature**, v.340, p.290-294, 1989.

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

BALAKUMAR, T.; GAYATHRI, B.; ANBUDURAI, P.R. Oxidative stress injury in tomato plants induced by supplemental UV-B radiation. **Biologia Plantarum**, v.39, p.215-221, 1997.

BARBER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharm**, v.34, p.26-35, 1994.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologica Plantarum**, v.19, p.47-64, 1997.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BECANA, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiologia Plantarum**, v.109, p.372-381, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends in Plant Science**, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-344, 1999b.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry,** v.3, p.199-208, 1999c.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, v.6, p.508-509, 2001.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photooxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant and Cell Environment**, v.25, p.737-748, 2002.

BELIGNI, M.V. et al. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, v.129, p.1642-1650, 2002.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and. Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.

BETHKE, P.C.; BADGER, M.R.; JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p.332-341, 2004.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.517-526, 2006.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** New York: Plenum Press, p. 445, 1994.

BLACKBURN, G.A. Spectral indices for estimating photosynthetic pigment concentrations: a test using senescent tree leaves. **International Journal of Remote Sensing**, v.19, p.657-675, 1998.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v.91, p.179-194, 2003.

BLUMTHALER, M.; AMBACK W. Indication of increasing solar UV-B radiation flux in alpine regions. **Science**, v.248, p.206-208, 1990.

BOEGER, M.R.T.; POULSON M.E. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, v.329-338, 2006.

BOLWELL, G.P. Role of reactive oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.287-294, 1999.

BOR, M.; ÖZDEMIR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, v.164, p.77-84, 2003.

BORNMAN, J.F. & VOGELMANN, T.C. Effect of UV-B radiation on leaf optical properties measured with fiber optics. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.547-554, 1991.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

BRACELPA – BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, ASSOCIAÇÃO. **Desempenho do setor em 2006 e projeções para 2007**. Disponível em : <http://www.bracelpa.com.br>. Acesso em: 10 nov. 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CALDWELL, M.M. et al. Differential photosynthetic inhibition by ultraviolet radiation in species from the artic-alpine life zone. **Artic and Alpine Research**, v.14, p.195-202, 1982.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: **Peroxidases in Chemistry and Biology** (Everse, J.; Everse, K.E.; Grisham, M.B., eds.), v.2, p.25-50. CRC Press, Boca Raton, FL., 1991.

CATANEO, A.C. et al. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira Herbicidas**, v.4, p.23-31, 2005.

CAVALCANTI, F.R. et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activies do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea plants. **News Phytologist**, v.163, p.563-571, 2004.

CECHIN, I. et al. Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. **Radiation Environment Biophysics**, v.47, p.405-413, 2008.

CHANDRU, H.K. et al. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. **Plant Science,** v.164, p.935-941, 2003.

CHEN, K. et al. Nitric oxide alleviates oxidative damage in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* caused by UV-B radiation. **Folia Microbiol.**, v.48, p.389–393, 2003.

COONEY, R.V. et al. Light mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environmental Health Perspective**, v.102, p.460-462, 1994.

COSTA, H.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Plant Science**, v.162, p.939-945, 2002.

CUETO, M. et al. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. **FEBS Letters**, v.398, p.159-164, 1996.

DAI, Q. et al. Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v.101, p.301-308, 1997.

DAY, T.A. Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. **Oecologia**, v.95, p.542-550, 1993.

DAY, T.A.; VOGELMANN, T.C. Alteration in photosynthesis and pigment distribution in pea leaves following UV-B exposure. **Physiologia Plantarum** v.94, p.433–440, 1995.

DECKMYN, G.; IMPENS, I. Seasonal responses of six Poaceae to differential levels of solar UV-B radiation. **Environmental and Experimental Botany**, v.41, p.177-184, 1999.

De VOS, C.H.R. et al. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus.* **Plant Physiology**, v.135, p.165-169, 1989.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: **Causes of Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants** (Foyer, C.H.; Mulineaux, P.M. Eds.), p.219-236. CRC. Boca Raton. F.L., 1994.

DOUDICAN, N.A. et al. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.25, p.5196-5204, 2005.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v.95, p.10328-10333, 1998.

EKLER, Z.; DUTKA, F.; STEPHENSON, G.R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. **Weed Research**, v.33, p.311-318, 1993.

ELSTERN, E.F. Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELLAND, E.J.; STEFFEN, K.L. (Eds). **Active Oxygen/Oxidative Stress in Plant Metabolism** Rockville: Am. Soc. Plant Physiol, p.13-25, 1991.

FAO. Global **Forest resources assessment 2000 – main report**. FAO Forestry paper. Disponível em < http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp > Acesso em 8 nov. 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil,** v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal do *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, 1997, Salvador. **Anais EMBRAPA/CNPF**, p. 14-34, 1997.

FERREIRA, L.C. **Ação protetora do óxido nítrico em plantas de soja (*Glycine max* L. Merril) submetidas ao lactofen**. Botucatu, 2007. 155p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

FERRER, M.A.; ROS BARCELO, A. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H_2O_2 production by xilem of *Zinnia elegans*. **Plant and Cell Environment.**, v.22, p.891-897, 1999.

FLOWERS, T. J. et al. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.99-106, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.355-364, 2003.

FOYER, C.H. et al. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.241-254, 1997.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, p.1056, 2005.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.28, p.273-314, 1989.

GASPAR, T. et al. A twostep control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, v.64, p.418-423, 1986.

GEOFFROY, L. et al. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmos obliquus*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, v.72, p.178-185, 2002.

GILLE, G., SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiology**, v.40, p.131-152, 1995.

GONG, H. et al. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. **Plant Science**, v.169, p.313–321, 2005.

GONZÁLEZ, E.R. et al. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* X *E. urophilla* using sonication assisted Agrobacterium transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v.29, p.97-102, 2002.

GREENBERG, B.M. et al. 1997. The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: W. Wang; J.W. Gorsuch & J.S. Hughes (eds.). **Plants for environmental studies**. Boca Raton, CRC Press.

GUENTHER, E. History, Origin in Plants, production and analysis. In: **The Essential Oils**, 4. ed. New York: Van Nostrand, 1977.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. **Biochemistry Journal**., v.219, p.1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, Oxford: Oxford University Press, p. 543, 1989.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward ? **Cardiovascular Research**, v. 47, p.410-418, 2000.

HAN, C.; LIU, Q.; YANG, Y. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. **Plant and Growth Regulations**. v.58, p.153-162, 2009.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-196, 1968.

HENZLER, T.; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina:* model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H_2O_2 across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.2053-2066, 2000.

HERNÁNDEZ, J.A., et al. Antioxidant systems and $O_2^{-\bullet}$/ H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, v.127, p.827-831, 2001.

HIDEMA, J.; SONG, I.K.; KUMAGAI, T. Relationship between ultraviolet-B sensitivity and cyclobutane pyrimidine dimmer photorepair in rice. **Journal Radiation Research**, v.42, p.295-303, 2001.

HOFMANN, R.W. et al. Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L. – physiological links to plant productivity and water availability. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.603-612, 2003.

HOQUE, E. & REMUS, G. Natural UV-screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) needles. **Photochemistry and Photobiology**, v.69, p.177-192, 1999.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulator**, v.42, p.227-238, 2004.

HUANG, X. et al. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.218, p.938-946, 2004.

HUNG, K.T.; KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescente of rice leaves induced by abscisic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.871-879, 2003.

INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.6, p.153-158, 1995.

JANSEN, M.; GABA, V.; GREENBERG, B.M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v.3, p.131-135, 1998.

JIMÉNEZ, A. et al. Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, v.118, p.1327-1335, 1998.

JOHNSON, G.A., DAY, T.A. Enhancement of photosynthesis in *Sorghum bicolor* by ultraviolet radiation. **Physiologia Plantarum**, v.116, p.554-562, 2002.

JUNIOR, E.P. **Modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algas marinhas: função dos carotenóides e efeitos do estresse ambiental.** São Paulo, 2002. 115 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

KAKANI, V.G. et al. Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.120, p.191-218, 2003.

KIM, J.S. et al. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.78, p.127-139, 2004.

KIRCHHOFF, V.W.J.H. et al. Evidence for an ozone hole perturbation at 30° south. **Atmospheric Environment**, v.30, p.1481-1488, 1996.

KOPYRA, M.; GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seeds germination and counteracts the inhibitory effect heavy metals and salinity on roots growth of *Lupinus luteus.* **Plant Phisiology and Biochemistry**, v.41, p.1011-1017, 2003.

KRIZEK, D.T. et al. Response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. **Physiologia Plantarum**, v.88, p.350-358, 1993.

KRUPA, S.V.; KICKERT, R.N. The greenhouse effect, the impacts of carbon dioxide, ultraviolet-B radiation and ozone on vegetation (crops). **Vegetatio**, v.104-105, p.224-238, 1993.

LASPINA, N.V. et al. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Science**, v.169, p.323–330, 2005.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regulation**, v.18, p.155-169, 1996.

LEVINE, A. et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.

LI, L.; LU, S.; CHIANG, V. A genomic and molecular view of wood formation. **Critical Reviews in Plant Science**, v.25, p.215-233, 2006.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.

LIMA, W.P. Impacto Ambiental do Eucalipto. São Paulo: **EDUSP**, 1993. 301 p.

LINDOO, S.J.; CALDWELL, M.M. Ultraviolet-B induced inhibition of leaf expansion and promotion of anthocyanin production. **Plant Physiology**, v.61, p.278-282, 1978.

LIU L.; GITZ D.C.; MCCLURE W. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.725–733, 1995.

LORRAIN-SMITH, J. The patological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed**. Journal of Physiology**, v.24, p.19-25, 1899.

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

MACKERNESS, S.A.H. et al. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, p.88-96, 1998.

MALAN, C.; GREGLING, M.M.; GRESSEL, J. Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. **Plant Science**, v.69, p.157-166, 1990.

MALANGA, G.; PUNTARULO, S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.672-679, 1995.

MARK, U.; TEVINI, M. Effects of solar ultraviolet-B radiation, temperature and CO_2 on growth and physiology of sunflower and maize seedlings. **Plant Ecology**, v.128, p.225-234, 1997.

MAZZA, C.A. et al. Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in filed-grown soybean crops. **Plant Physiology**, v.122, p.117-125, 2000.

MEIJKAMP, B.B.; DOODEMAN, G.; ROZEMA, J. The response of *Vicia faba* to enhanced UV-B radiation under low and near ambient PAR levels. **Plant Ecology**, v.154, p.137-146, 2001.

MENEZES, S.M. et al. Detecção de soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato por métodos baseados na atividade de enzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.2, p.150-155, 2004.

MISRA, N.; GUPTA, A.K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.11-18, 2006.

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

MODOLO, L.V. et al. Nitric oxide synthase mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* elicitor. **Plant Physiology**, v.130, p.1288-1297, 2002.

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

MORLEY, N., et al. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. **Journal of Photochemistry and Photobiology**,. v.72, p.55–60, 2003.

MURO-ABAD, J.I. et al. Genetic analysis of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* clones selected in commercial crops from the Brazilian Amazon by RAPD markers. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.50, p.177- 181, 2001.

MUSIL, C.F. et al. Nitrate additions enhance the photosynthetic sensitivity of a nodulated South African Mediterranean-climate legume (*Podalyria calyptrata*) to elevated UV-B. **Environmental and Experimental Botany**, v.50, p.197-210, 2003.

NEILL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1237-1247, 2002.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytologist**, v.159, p.11-35, 2003.

NIYOGI, K.K., et al. Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. **Photosynth. Research**, v.67, p.139-145, 2001.

NOCTOR, G.; FOYER, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control**.** **Annual Review Plant Physiology Molecular Biology**, v.49, p.249-279, 1998.

NORITAKE, T.; KAWAKITA, K.; DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant and Cell Physiology**, v.37, p.113-116, 1996.

O Eucalipto e suas origens. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 59, ano 11, set. 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br/revista> Acesso em: 10 nov. 2008.

OP DEN CAMP, R. G. et al. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.15, p.2320-2332, 2003.

PAGNUSSAT, G.C. et al. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiology**, v.129, p.954-956, 2002.

PANAGOPOULOS, L.; BORNMAN, J.F.; BJORN, L.O. Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, flourescence induction, ultra weak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.8, p.73-87, 1990.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant and Cell Environment**, v.15, p.719-725, 1992.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.842-847, 2002.

PRASAD, M.N.V.; RENGEL, Z. Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress. **Annual New York Academy of Science**, v.851, p.216-223, 1998.

PRASAD, K.V.S.K.; SARANDHI, P.P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, v.42, p.1-10, 1999.

PRYOR, L. D.; JOHNSON, L.A.S. **A classification of the *Eucalyptus*.** Camberra: Australian National University Press, 112 p. 1971.

PRYOR, L.D.; WILLIAMS, E.R.; GUNN, B.V. A morphometric analysis of *Eucalyptus urophylla* and related taxa with descriptions of two new species. **Australian Systematic Botany**, v.8, p.57-70, 1995.

RADETSKI, C.M., COTELLE, S., FÉRARD, J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p.221-229, 2000.

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

RAO, M.V., PALIYATH, G., ORMROD, D.P. Ultraviolet-B- and ozoneinduced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.110, p.125-136, 1996.

REMAEH, L.M.R. **Efeito do óxido nítrico em plantas de eucalipto (*Eucalyptus saligna*) tratadas com o herbicida oxyfluorfen**. Botucatu, 2008. 109p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

ROMERO, F.J. et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environmental Health. Perspectives**, v.106, p.1229-1234, 1998.

RONTANI, J.F. Visible light-dependent degradation of lipidic phytoplanktonic components during senescente: a review. **Phytochemistry**, v.58, p.187-202, 2001.

ROZEMA, J. et al. Leaf thickness and UV-B absorbing pigments of plants in relation to an elevational gradient along the Blue Mountains, Jamaica. **Plant Ecology**, v.128, p.150-159, 1997.

RUBBO, H. et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxinitrite dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. **Journal of Biology Chemistry**, v.269, p.26066-26075, 1994.

SAHAI, Y., KIRCHHOFF, V.W.J.H., LEME, N.M.P. Total ozone trends in the tropics. **Journal of Geophysical Research**, v.105, p.19823-19828, 2000.

SAMPSON, J.F.; HOPPER, S.D.; JAMES, S.H. The mating system and genetic diversity of the Australian Arid Zone Malle, *Eucalyptus rameliana*. **Australian Journal of Botany**, v.43, p.461-474, 1995.

SANGTARASH, M.H. et al. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiatIon, water stress and abscisic acid. Article in Press. **Environmental and Experimental Botany** (2009), doi:10.1016/j.envexpbot.2009.03.004

SANTOS, P.E.T. et al. Potencial para programas de melhoramento, estimativas de parâmetros genéticos e interação progênies x locais em populações de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **IPEF**, Piracicaba, n.43/44, p.1119, 1990.

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

SANTOS, I. et al. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. **Plant Science**, v.167, p.925-935, 2004.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology,** v.101, p.7-12, 1993.

SEARLES, P.S; FLINT, S.D; CALDWELL, M.M. A meta-analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion. **Oecologia**, v.127, p.1-10, 2001.

SELOTE, D.S.; BHARTI, S.; CHOPRA, R. K Drought acclimation reduces $O_2^{-\cdot}$ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.314, p.724-729, 2004.

SELVAKUMAR, V. Ultraviolet-B radiation (280-315 nm) invoked antioxidant defence systems in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Crotalatia juncea* L. **Photosynthetica**, v.46, p.98-106, 2008.

SHAH, K. et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, v.161, p.1135-1144, 2001.

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.13, p.1-9, 2005.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases: an organism perspective. **Plant Growth Regulation**, v.12, p.303-312, 1993.

SILVA, J. C. Cresce presença do eucalipto no Brasil**. Revista da Madeira**, n. 92, p.61-66, 2005.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. **New Phytologist**, v.125, p.27-28, 1993.

SMITH, J.L.; BURRITT, D.J. & BANNISTER, P. Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. **Annals of Botany**, v.86, p.1057-1063, 2000.

SOMASHEKARIAH, B.V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.85-89, 1992.

STRATMANN, J. Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. **Trends in Plant Science**, v.8, p.526-533, 2003.

SUJAK, A., et al W.I. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: The structural aspects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.371, p.301-307, 1999.

SUN, B. et al. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Biology**, v.164, p.536-543, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2004, 719p.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science,** v.153, p.65-72, 2000.

TEVINI, M.; TERAMURA, A.H. UV-B effects in terrestrial plants. **Photochemistry and Photobiology**, v.50, p.479-487, 1989.

TEVINI, M. UV-effects on plants, in: SINGHAL, G.S.; RENGER, G.; SOPORY, S.K.; Irrgang Govindjee (Eds.), **Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis**, Kluwer Academic Publishers, p.588-613, 1999.

THOMAS, D.D. et al. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O2. **Proceedings of the National Academic of Sciences,** v.98, p.355-360, 2001.

TREBST, A., DEPKA, B. Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. **FEBS Letter**, v.400, p.359-362, 1997.

TSANG, E.W.T. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **The Plant Cell**, v.3, p.783-792, 1991.

TSUGANE, K. et al. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. **The Plant Cell,** v.11, p.1195-1206, 1999.

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VEGA, M.P.; PIZARRO, R.A. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran Daphnia longispina exposed to UV-B radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** v.54, p.121-125, 2000.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v.164, p.645-655, 2003.

VRANOVÁ, E.; INZE, D. ; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal Experimental Botany**,53, p.1227-1236, 2002.

WANG, P.G. et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chemistry Review**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WANG, G. et al. The involvement of the antioxidant system is proctection of desert cyanobacterium *Nostoc* sp. against UV-B radiation and the effects of exogenous antioxidants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.150-157, 2008.

WHITE, A.L.; JAHNKE, L.S. Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of X -carotene in two *Dunaliella sp.* **Plant Cell Physiology**. v.43, p.877–884, 2002.

WIECZOREK, J. F. et al. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v.224, p.1363-1372, 2006.

WINK, D.A. et al. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, v.82/83, p.221-226, 1995.

WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. **Phytochemistry**, v.54, p.1-4, 2000.

WU, C.H. et al. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. **Journal of Plant Biology**, v.50, p.636-643, 2007 .

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new feature of an old enzyme. **Trends in Plant Science**, v.4, p.128-129, 1999.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxinitrite by plant nitrate reductase in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Letters**, v.468, p.89-92, 2000.

YAO, X.; LIU, Q. Changes in morphological, photosynthetic and physiological responses of Mono Maple seedlings to enhanced UV-B and to nitrogen addition. **Plant Growth Regulator**, v.50, p.165-177, 2006.

YU, Q.; OSBORNE, L.; RENGEL, Z. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, p.1427-1437, 1998.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.489-493, 1996.

ZHANG, L. et al. Protective effect of nitric oxide against oxidative damage in *Arabidopsis* leaves under ultraviolet-B irradiation. **Journal of Plant Physiology**, v.52, p.135-140, 2009

ZHAO, M. et al. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.737-745, 2007.

ZHU, J-K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.66-71, 2001.

ZIEMKE, J.R.; CHANDRA, S.; HERMAN, J. Erythemally weighted UV trends over northern latitudes derived from Nimbus 7 TOMS measurements. **Journal of Geophysical Research**, v.105, p.7373-7382, 2000.

ZILBERSTEIN, B.; FLORA, F.R. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções**. Revista Associação Médica Brasileira**, v.46, p.265-271, 2000.