



RENATA MAURI

**EFEITO E DETECÇÃO DE REGULADORES DE
CRESCIMENTO NO LENHO DE EUCALIPTO**

LAVRAS-MG

2016

RENATA MAURI

**EFEITO E DETECÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO
LENHO DE EUCALIPTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração em Madeira como Matéria-Prima, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Natalino Calegario

Orientador

LAVRAS-MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Mauri, Renata.

Efeito e detecção de reguladores de crescimento no lenho de eucalipto / Renata Mauri. – Lavras : UFLA, 2016.

160 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Natalino Calegario.

Bibliografia.

1. Características da madeira. 2. Auxina. 3. Giberelina. 4. Gradientes hormonais. 5. LC–MS/MS. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

RENATA MAURI

**EFEITO E DETECÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO
LENHO DE EUCALIPTO**

***EFFECT OF GROWTH REGULATORS AND DETECTION IN
EUCALYPTUS WOOD***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, área de concentração em Madeira como Matéria-Prima, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 26 de agosto de 2016.

Prof. Dr. José Tarcísio Lima	UFLA
Profa. Dr. Ana Carolina Maioli Campos Barbosa	UFLA
Dr. Helbert Rezende de Oliveira Silveira	EPAMIG
Prof. Dr. José Tarcísio da Silva Oliveira	UFES

Prof. Dr. Natalino Calegario
Orientador

LAVRAS-MG

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha família e marido por me ampararem nos momentos difíceis e me darem força interior para superar as dificuldades.

Ao Programa de Ciência e Tecnologia da Madeira (PPGCTM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização do doutorado e pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e professores do PPGCTM pelos ensinamentos. Agradecimento especial ao professor Dr. José Tarcísio Lima por ter acreditado na relevância acadêmica deste trabalho e pelo tempo dedicado em estudos e ensinamentos. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade que sempre me inspirarão.

À EMS por ceder equipamentos e analistas excepcionais que resultou na confecção do capítulo 3 desta tese. Agradecimento especial à Carlos Nahum, Fábio A. P. Barros e Renan M. B. Dezena pela gentileza, atenção e acolhimento.

RESUMO GERAL

Hormônios vegetais são substâncias orgânicas que desempenham importantes funções na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. Auxina (IAA) e giberelina (GA) são os principais hormônios envolvidos no processo de xilogênese. Diversos estudos com aplicação exógena de GA e IAA, isoladamente e em conjunto, foram conduzidos com intuito de elucidar suas ações no corpo vegetal. Constantemente a aplicação conjunta de IAA e GA promoveu maior crescimento e desenvolvimento vegetal, o que promoveu seu uso na forma de reguladores vegetais em plantas de interesse agrônomico. Atualmente a aplicação exógena de hormônios vegetais é uma prática comum em muitas culturas agrícolas, ocorrendo em diversas configurações, as quais são utilizadas para diversos fins. No entanto, no setor florestal, salvo em processos de propagação de tecidos *in vitro* e enraizamento de estacas, ainda não há o uso de hormônios como uma prática silvicultural para aumento da produtividade e qualidade da madeira. Para que a aplicação exógena de IAA e GA torne-se uma prática silvicultura é necessário determinarmos as concentração e relações ideais desses hormônios por meio de experimento dose-resposta, conforme relatado no capítulo 2 desta tese. Além de seu uso prático, por meio de aplicação exógena, faz-se de grande importância o entendimento da forma de ação dos hormônios vegetais. Prioridade deve ser dada ao IAA, uma vez que, diversos estudos têm demonstrado o IAA como sendo o principal organizador da regulação das dimensões celulares e da padronização espacial do desenvolvimento dos tecidos vasculares por meio de seus gradientes de concentração longitudinal e radial, respectivamente. O desenvolvimento de um conceito unificador para o papel do IAA no corpo vegetal depende, dentre outros, do conhecimento detalhado de sua distribuição final, o qual pode ser alcançado por meio de técnicas de altamente sensíveis de quantificação de IAA a partir de micro-amostras do corpo vegetal. O capítulo 3 desta tese relata uma técnica promissora utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) equipado com uma interface de ionização por electropulverização (ESI).

Palavras-chave: Características da madeira. Gradientes hormonais. Auxina. Giberelina. LC-MS/MS.

GENERAL ABSTRACT

Plant hormones are organic substances that perform important functions for growth regulation and plant development. Auxin (IAA) and gibberellin (GA) are the main hormones involved in the process of xilogenesis. Many studies in the exogenous application of GA and IAA, separately and jointly, were conducted in order to elucidate its actions in the plant. The joint application of GA and IAA has constantly promoted greater growth and plant development, which promoted its use as regulators for agriculturally interesting plants. Currently, the exogenous application of plant hormones is a common practice in many agricultural cultures, occurring in many configurations, which are used for various ends. However, in the forestry sector, with the exception of *in vitro* tissue propagation and stake rooting, the hormones are not yet used as a silvicultural practice for increasing productivity and wood quality. In order for the exogenous application of IAA and GA to become a silvicultural practice, it is necessary to determine the ideal concentrations and relations of these hormones by means of a dose-response experiment, according to the reported in chapter 2 of this dissertation. In addition to its practical use, by means of the exogenous application, it is of great importance to understand the form of action of the plant hormones. Priority must be given to IAA, since many studies have shown IAA as the main regulation organizer of the cellular dimensions and spatial standardization of the development of vascular tissue by means of its longitudinal and radial concentration gradients, respectively. The development of a unifying concept for the role of IAA in the plant depends, among other things, on the detailed knowledge of its final distribution, which can be achieved by using techniques highly sensitive to IAA quantification from micro-samples of the plant. The 3rd chapter of this dissertation reports a promising technique using the high performance liquid chromatography system coupled to sequence mass spectrometry (LC-MS/MS) equipped with electrospray ionization interface (ESI).

Keywords: Wood traits. Hormonal gradients. Auxin. Gibberellin. LC-MS/MS.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Organização da tese	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Efeito dos hormônios na fotossíntese	13
2.2	Efeito dos hormônios na partição e alocação de fotossintatos	15
2.3	Os hormônios e a xilogênese	18
2.3.1	Divisão celular	18
2.3.2	Diferenciação e expansão celular	20
2.3.3	Espessamento e lignificação da parede celular	24
2.4	Regulação de dimensões e frequência celular por gradiente hormonal	26
2.5	Aplicações comerciais de hormônios na agricultura	31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	35
	CAPÍTULO 2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO XILEMA SECUNDÁRIO DE PLANTAS INTACTAS <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus urophylla</i> TRATADAS COM HORMÔNIOS VEGETAIS	49
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	Manejo da irrigação	53
2.2	Experimento dose-resposta a hormônios vegetais	54
2.3	Padrão de crescimento da planta	54
2.4	Avaliações fisiológicas	55
2.5	Determinação de massa seca	56
2.6	Determinação do índice de área foliar (IAF)	56
2.7	Determinação da densidade básica da madeira	57
2.8	Análise anatômica	57
2.9	Composição química da madeira	59
2.10	Análise estatística	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
3.1	Crescimento e alterações fisiológicas das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais	61
3.1.1	Análise de crescimento	61
3.1.2	Trocas gasosas	69
3.1.3	Alocação e partição de biomassa	78
3.2	Variação anatômica ao longo do caule das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais	86

3.2.1	Variação morfológica das fibras ao longo do caule	86
3.2.2	Variação morfológica dos elementos de vasos ao longo do caule	94
3.2.3	Variação morfológica dos raios ao longo do caule.....	99
3.3	Variação anatômica média da madeira em experimento dose-resposta a hormônios vegetais.....	103
3.3.1	Fibras	103
3.3.2	Elementos de vasos	107
3.3.3	Raios	110
3.4	Variação física e química do xilema das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais	112
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
	REFERÊNCIAS	121
	CAPÍTULO 3 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE IAA EM TECIDOS DA ZONA CAMBIAL	133
1	INTRODUÇÃO.....	135
2	MATERIAL E MÉTODOS	137
2.1	Preparação de amostras para análise hormonal	137
2.2	Reagentes.....	137
2.3	Procedimento para quantificação do hormônio IAA	138
2.3.1	Método de extração	138
2.3.2	Preparo das soluções analíticas.....	138
2.3.3	Otimização das condições do espectrômetro de massas e UPL	139
2.3.4	Validação parcial do método.....	142
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	145
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	157
	REFERÊNCIAS	159

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Sendo organismos sésseis, as plantas devem ser extremamente sensíveis ao seu redor e capaz de responder às mudanças constantes no ambiente. De fato, muitas espécies arbóreas devem permanecer no mesmo local durante centenas de anos. Assim, as plantas desenvolveram uma capacidade de resposta em seu padrão de crescimento a estímulos do ambiente, a fim de sobreviver a condições bióticas e abióticas menos propícias. Isto requer uma certa plasticidade em seu desenvolvimento, a qual é mediada por moléculas sinalizadoras denominadas hormônios. Segundo Roberts (1988) e Yamaguchi (2008) quase todos os processos fisiológicos são regulados por duas ou mais classes de hormônios, simultaneamente ou em alguma ordem sequencial, desta forma, os hormônios vegetais são os responsáveis pela regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal.

Inicialmente foram identificados cinco grupos de hormônios vegetais, que são considerados como fitormônios clássicos. Estes incluem auxina, citocinina, giberelina, ácido abscísico e etileno. Recentemente, esta lista de fitormônios foi expandida para incluir vários outros, como os brassinosteróides, ácido jasmônico, ácido salicílico, poliaminas, estrigolactona e hormônios peptídicos (SANTNER; CALDERON-VILLALOBOS; ESTELLE, 2009). Não seria surpreendente se esta lista continuar a crescer para incluir muitos mais novos compostos.

Especificamente para a formação de xilema secundário, tem sido fundamentado, com base na capacidade da giberelina em associação com auxina em induzir a formação de uma mistura de fibras e vasos, e auxina exógena sozinha em induzir novos vasos (ALONI et al., 2000). Assim, segundo os

mesmos autores, as giberelinas são consideradas um fator essencial para indução de novas fibras.

Desta forma, auxina e giberelina são os hormônios considerados nesta tese. A principal auxina identificada nas plantas é o ácido indol-3-acético (IAA), produzido nos meristemas, primórdios foliares, tecidos vasculares jovens e órgãos reprodutivos. Enquanto que as giberelinas (GA's) já foram identificadas mais de 137, sendo as mais ativas a GA₁, GA₃, GA₄, GA₇, GA₉ e GA₂₀; as demais são intermediárias na síntese de giberelinas ou formas de inativação (TAIZ; ZEIGER, 2006). Acredita-se que as giberelinas sejam sintetizadas nas partes em rápido crescimento das plantas (DAVIES, 2004; SPONSEL; HEDDEN, 2004).

O transporte da auxina é um processo dinâmico e complexo que é regulado em diversos níveis diferentes (MORRIS; FRIML; ZAŽÍMALOVÁ, 2004). No corpo secundário de árvores, há diversos percursos de transporte de auxina (ALONI, 2004), sendo a principal via a zona cambial e seus derivados mais recentes (SUNDBERG; UGGLA; TUOMINEN, 2000).

Relativo ao transporte de GA's, tradicionalmente, pensava-se que a giberelina fosse provavelmente transportada no floema e xilema (DAVIES, 1995). No entanto, novas evidências sugerem que a biossíntese de giberelina e a sua ação ocorrem nos mesmos tecidos, e possivelmente até mesmo nas mesmas células (SPONSEL; HEDDEN, 2004).

Foi demonstrado que o transporte de IAA em árvores de *Pinus* sp. gera um gradiente longitudinal de distribuição, no qual maiores concentrações de IAA são observadas próximas à copa com redução em direção à base do fuste (UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998). Pelo conhecimento dos autores não há estudos de gradientes longitudinais para GA. Quanto à distribuição radial, ambos IAA e GA possuem gradiente radial acentuado entre os tecidos da região cambial. A distribuição radial de IAA apresenta

concentração mais elevada na zona de divisão celular e concentrações decrescentes no sentido de amadurecimento do xilema e do floema (TUOMINEN et al., 1997; UGGLA et al., 1996), enquanto GA apresenta concentração máxima na zona de células xilemáticas em alargamento (ISRAELSSON; SUNDBERG; MORITZ, 2005).

Estudos com hormônios vegetais podem conduzir a grandes avanços para a pesquisa científica, uma vez que estas moléculas sinalizadoras são responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento vegetal. Os hormônios além de serem produzidos pelas plantas podem ser aplicados exógenamente na forma de reguladores vegetais. O uso de reguladores vegetais no meio agrônômico vem apresentando resultados bastante significativos em plantas bem nutridas (VIEIRA; CASTRO, 2001). Assim parece oportuno estudar o efeito dos hormônios sobre o desenvolvimento de plantas do gênero *Eucalyptus*, que hoje é de grande importância econômica para o país.

O objetivo deste capítulo foi apresentar o estado da arte do efeito dos hormônios vegetais no desenvolvimento das plantas focando-se no efeito dos hormônios auxina e giberelina no processo de formação da madeira.

1.1 Organização da tese

Esta tese foi dividida em três capítulos, a saber:

- a) Capítulo I - Aborda o estado da arte sobre o efeito dos hormônios vegetais no desenvolvimento das plantas. Especial atenção foi dada aos efeitos da auxina e giberelina no processo de formação da madeira, por serem descritos como os hormônios com efeitos mais notáveis sobre o desenvolvimento da mesma.

- b) Capítulo 2 - Relata um experimento dose-resposta a aplicações de combinações de auxina e giberelina em plantas intactas de *Eucalyptus*.
- c) Capítulo 3 – Relata o desenvolvimento de uma metodologia capaz de quantificar o hormônio auxina em pequenas amostras de tecidos da zona cambial.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Efeito dos hormônios na fotossíntese

A fotossíntese é um processo fisiológico essencial ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas. A taxa fotossintética (a quantidade líquida de carbono fixado por unidade de área foliar por unidade de tempo) determina a quantidade total de carbono fixado disponível para a folha, no entanto, a quantidade de carbono fixado disponível para translocação depende de eventos metabólicos subsequentes (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A entrada do gás carbônico nas plantas através dos estômatos é mediada por um complexo enzimático, formado de 16 subunidades, denominado Rubulose 1,5-bisfosfato Carboxilase Oxigenase (Rubisco) (TAIZ; ZEIGER, 2006). Durante o processo fotossintético, o CO₂ é convertido em ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) e gliceraldeído-3-fosfato (3-PGALD), levando à produção de terpenos, ácidos graxos e, principalmente, à biossíntese de açúcares, que representa mais de 80% dos fotoassimilados (MELIS, 2013). Os fotoassimilados, por sua vez, constituem mais de 90% da massa seca da planta, sendo que parte desses assimilados é utilizada durante o crescimento, convertendo-se em biomassa, e a outra é oxidada na respiração, servindo como fonte de energia para o crescimento e funcionamento dos processos biológicos (LALONDE et al., 2003).

Geralmente, espécies de plantas com uma taxa de crescimento relativamente elevada têm maiores taxas de fotossíntese por unidade foliar (ATKIN; BOTMAN; LAMBERS, 1996; POORTER; REMKES; LAMBERS, 1990; WESTBEEK et al., 1999), mas essa relação não é direta, ou seja, quanto maior a fotossíntese maior o crescimento. O crescimento da planta será dependente de um conjunto de fatores que englobam, além da taxa de

fotossíntese por unidade foliar, os processos subsequentes à fotossíntese e à arquitetura da copa (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A relação entre taxa de crescimento e fotossíntese é dada por um mecanismo de retroalimentação (feedback), onde não só a taxa fotossintética pode modificar o crescimento, mas também, a taxa de crescimento pode influenciar a taxa fotossintética. A base deste mecanismo é que a alta concentração de fotoassimilados aumenta a capacidade dos drenos já existentes e estimula a formação de novos drenos. A incapacidade do organismo de criar novos drenos (ou aumentar os existentes) leva ao acúmulo de carboidratos nas folhas o que resulta na inibição da taxa fotossintética (PAUL; FOYER, 2001; PAUL; PELLNY, 2003).

Outro aspecto importante na relação crescimento e fotossíntese são os atributos arquitetônicos das plantas, como por exemplo, o padrão de distribuição vertical do índice de área foliar (IAF) e a orientação dos limbos foliares que influenciam significativamente a interceptação da radiação e, conseqüentemente, o balanço de energia e as trocas gasosas entre planta e ambiente (BARNES et al., 1990; DUNCAN, 1971; LOOMIS; WILLIAMS, 1969). A utilização ótima da radiação fotossinteticamente ativa na fotossíntese geralmente ocorre quando a radiação é distribuída uniformemente pela copa, não ocorrendo saturação por luz no estrato superior da copa e nem falta de radiação nos estratos inferiores do dossel vegetativo (LONG; HÄLLGREN, 1993). Desta forma, altos valores de IAF (m^2 de folha/ m^2 de solo) podem levar a uma redução na eficiência de interceptação da luz, porque menos radiação é interceptada pelas folhas mais velhas localizadas na parte de baixo do dossel, levando-as a senescer precocemente (TEJERA et al., 2007). Assim, a fotossíntese da copa é composta de três parâmetros: índice de área foliar (IAF), eficiência de interceptação de luz e fotossíntese por unidade de área foliar (ISHII, 1998).

Alguns estudos têm relatado que a aplicação de GA reforçou a fotossíntese e crescimento (HAYAT et al., 2001; KHAN, 1996; YUAN; XU, 2001), enquanto outros descobriram que a aplicação de GA estimulou o crescimento, mas diminuiu a taxa de fotossíntese (DIJKSTRA; REEGEN; KUIPER, 1990). Thetford et al. (1995) verificaram que a aplicação de inibidores da biossíntese de GA estimulou a fotossíntese, enquanto reduziu o crescimento, ao passo que outros encontraram uma redução de ambos (BODE; WILD, 1984; HEIDE; BUSH; EVANS, 1985). Cramer et al. (1995) não encontraram nenhuma diferença nas taxas de fotossíntese entre plantas de tomate do tipo selvagem e mutantes com baixa produção de GA. Segundo Nagel e Lambers (2002) entre as possíveis causas desses resultados contraditórios estão as diferentes maneiras de medir e expressar o crescimento e a fotossíntese, as diferentes escalas de tempo durante o qual os efeitos no crescimento e fotossíntese foram medidos, e os diferentes métodos de aplicação da GA ou de inibidores da síntese de GA.

Estudos realizados em *Rumex* e alface demonstraram que a giberelina pode inibir a senescência de discos foliares por vários dias, retardando a degradação de clorofila e proteína, sendo que, quando GA foi aplicado exogenamente, esse efeito foi prolongado (SCHIPPERS et al., 2007). Também foi demonstrado que a aplicação exógena de auxina reprime a regulação dos genes associados à senescência foliar (SARWAT et al., 2013). Esses resultados reafirmam a importância da IAA e GA no processo fotossintético.

2.2 Efeito dos hormônios na partição e alocação de fotossintatos

Os fotossintatos são translocados pelo floema a partir de áreas de suprimento, conhecidas como fontes (ex.: folhas maduras), para áreas de consumo (metabolismo) ou estoque, conhecidas como drenos (ex.: meristemas). Embora o modelo de transporte pelo floema represente simplesmente o movimento dos fotossintatos a partir da fonte para o dreno, o caminho específico

entre eles é altamente complexo, pois nem todos os drenos são igualmente supridos por todas as folhas da planta (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O modelo de distribuição dos fotossintatos (partição de fotossintatos) é, em grande parte, uma função a) da proximidade entre os órgãos, ou seja, distância entre a fonte e o dreno, b) da quantidade de conexões vasculares entre os órgãos, ou seja, da quantidade de elementos crivados entre a fonte e o dreno, e c) da competição entre os drenos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

As sinalizações entre as fontes e os drenos podem ser físicas (pressão de turgor nos elementos crivados) ou químicas (hormônios, nutrientes e carboidratos). Vários experimentos sugerem que a capacidade do dreno em mobilizar fotossintatos em sua direção (intensidade do dreno) depende de dois fatores: 1) do tamanho do dreno que é o peso total do tecido-dreno, e 2) da atividade do dreno que é a taxa de absorção de fotossintatos, para estocagem ou metabolização (processo de alocação de fotossintatos), por unidade de peso do tecido-dreno. Desta forma, um dreno mais intenso pode exaurir o conteúdo de açúcar dos elementos crivados mais rapidamente e, assim, aumentar o gradiente de pressão e a taxa de translocação em sua própria direção (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Segundo Taiz e Zeiger (2006) os hormônios afetam a partição dos fotossintatos por controlarem o crescimento do dreno, a senescência foliar e outros processos do desenvolvimento. Quando IAA (BOOTH et al., 1962) e outros reguladores como citocininas, etileno e ácido giberélico (MULLINS, 1970) são aplicados em segmentos de caule, ou ABA é dissolvido na solução de enraizamento (KAPLAN; KOLLER, 1977), fotossintatos se acumulam na região de aplicação. Da mesma forma, o carregamento da sacarose na mamona é estimulado por auxina exógena e inibido por ABA, enquanto que o ABA exógeno promove e a auxina inibe a absorção de sacarose pelo tecido da raiz da beterraba (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Em mudas de feijão, em que foram regeneradas raízes e broto apical após suas excisões, o principal controle sobre a distribuição da sacarose entre os drenos (raiz e broto apical) foi atribuído às influências hormonais (IAA e citocininas) sobre a atividade do dreno, embora alguma influência sobreposta da disponibilidade de sacarose em relação aos respectivos drenos não possa ser excluída (GERSANI; LIPS; SACHS, 1980). Em experimentos com mutantes anões extremos de ervilha e *Arabidopsis*, nos quais a síntese de GA foi bloqueada, as raízes se apresentaram mais curtas que as plantas selvagens, e a aplicação de GA na parte aérea promoveu tanto o alongamento da parte aérea quanto da raiz (FU; HARBERT, 2003; YAXLEY et al., 2001).

Diversos estudos também demonstraram que os hormônios endógenos são reguladores essenciais para translocação e partição de fotoassimilados para o enchimento de grãos em culturas de cereais, e, portanto, poderiam estar envolvidos na regulação do peso dos grãos e rendimento (AHMADI; BAKER, 1999; BRENNER; CHEIKH, 1995; WANG; YU; PAN, 1999). Acredita-se que auxina e citocinina estejam envolvidas na regulação da força (intensidade) do dreno ou por mediação da divisão e alargamento celular do endosperma ou por controlar a importação de fotossintatos para o dreno (HANSEN; GROSSMANN, 2000). Por exemplo, citocinina (ASTHIR; KAUR; BASRA, 1998) e auxina exógena (DARUSSALAM; PATRICK, 1988) promoveram a acumulação de fotossintatos nos grãos de trigo em desenvolvimento.

Apesar de a maioria dos estudos sobre o regulamento hormonal no transporte e distribuição de fotossintatos estar concentrada em carboidratos existem evidências suficientes de que diferentes hormônios exógenos servem como moduladores de componentes limitante da taxa específica do metabolismo de fotoassimilados (BRENNER; CHEIKH, 1995).

A utilização dos carboidratos (açúcares) é amplamente maximizada quando o suprimento de açúcares é abundante, porém, quando o suprimento de

açúcar é baixo, a utilização é restrita aos locais que são cruciais para absorção de água e minerais (KOCH; WU; XU, 1996).

2.3 Os hormônios e a xilogênese

Do câmbio vascular se originam todos os tecidos do corpo vegetal secundário. O câmbio vascular tem sua origem no procâmbio no corpo vegetal primário (ESAU, 1974). Segundo Steeves e Sussex (1989), o câmbio é, teoricamente, consistindo de uma camada única de células iniciais que se dividem formando derivadas, embora esta única camada não seja geralmente distinguível microscopicamente. Alternativamente, o termo câmbio pode ser usado para descrever toda a região em divisão celular, que é então, constituída de várias células de largura.

No câmbio vascular, existem dois tipos diferentes de células iniciais: as iniciais fusiformes que dão origem aos elementos axialmente orientados, tais como vasos, fibras (traqueídeos em coníferas) e células de parênquima, e as iniciais radiais que dão origem a células dos raios, os quais são horizontalmente orientados (ESAU, 1974). Seguindo a divisão celular na zona cambial, as derivadas cambiais se desenvolvem em células de madeira por diferenciação, expansão, formação de parede secundária e, finalmente, autólise. Estas fases são separadas no espaço, o que resulta num padrão radial de zonas de desenvolvimento (LARSON, 1994).

2.3.1 Divisão celular

A divisão celular consiste de algumas etapas que constituem o ciclo celular. As fases do ciclo são: 1) período de crescimento da célula (G_1), o qual é caracterizado pela síntese de RNA e proteínas; 2) período de replicação do DNA (S), para a maioria das células este é um ponto de não retorno que leva necessariamente à divisão celular; 3) segundo período de crescimento da célula (G_2), neste período ocorre a preparação para a mitose. Desta forma, ocorre a

síntese de proteínas não histônicas e o acúmulo de um complexo proteico citoplasmático chamado de Fator Promotor da Maturação – MPF; e 4) divisão celular por mitose (M) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Diversos estudos com intuito de elucidar o controle sobre o ciclo celular foram realizados. Um exemplo notável foi o estudo com arroz em águas profundas realizado por Cho e Kende (1997). As plantas de arroz que sofrem rápido alongamento do caule, após submersão, mostraram que o alongamento ocorreu através de um aumento na divisão celular no meristema intercalar. Esta atividade é a divisão celular induzida por GA na transição de G_1 para a fase S (LORBIECKE; SAUTER, 1998). Além disso, GA regula progressão da fase G_2 para M por induzir a expressão de genes que codificam proteínas quinases dependentes de ciclinas (FABIAN et al., 2000). Segundo Junqueira e Carneiro (2012) ao final da fase G_2 a presença de citocinina é também essencial para a entrada na mitose, pois é ela que estimula a remoção do fosfato da tirosina da proteína Cdc2, promovendo assim a ativação do MPF. Segundo os mesmos autores o controle da progressão da fase G_1 para a S é também dependente da auxina.

Em experimento com remoção do broto apical e aplicação de IAA apicalmente observou-se que o IAA exógeno entra no sistema de transporte polar e imita o fornecimento de IAA endógena produzida pelo broto apical por induzir a divisão celular e produção de xilema e floema de uma forma dependente da dose, tanto em brotos jovens (CUI; LITTLE, 1993; DIGBY; WAREING, 1966; DOLEY; LEYTON, 1968; LITTLE; BONGA, 1974; SHERIFF, 1983; ZAJACZKOWSKY, 1973; ZAKRZEWSKI, 1983, 1991) como em troncos de árvores maduros (LEITCH; SAVIDGE, 1995; LITTLE; SUNDBERG, 1991). Da mesma forma, a aplicação de inibidores do transporte polar de IAA em torno da circunferência de ramos intactos de *Pinus sylvestris* imitou os efeitos do desfolhamento resultando assim tanto na depleção de IAA

como na inibição do crescimento cambial abaixo do ponto de tratamento (SUNDBERG; TUOMINEN; LITTLE, 1994).

Além das condições endógenas, a divisão celular é também controlada por fatores ambientais (FERRI, 1985). Pode-se citar a temperatura, que é um fator limitante durante a mitose, a qual é reduzida quando a temperatura diminui (TRAPY; GUERN, 1980) sendo a temperatura mínima para cerrar a mitose dependente da espécie. O balanço de água também desempenha um papel fundamental no crescimento do xilema: longos períodos de seca de 15 dias (LARSON, 1963) ou 30 dias (DÜNISCH; BAUCH, 1994) cessam a divisão celular. Segundo Aussenac (1993) e Kramer (1964) durante um estresse hídrico, a atividade cambial cessa antes da fotossíntese e outros processos fisiológicos.

2.3.2 Diferenciação e expansão celular

Na maioria das células vegetais, a diferenciação está associada à expansão celular. A diferenciação é a etapa do desenvolvimento celular menos compreendida, muito provavelmente devido à complexidade dos resultados de experimentos com intuito de elucidá-la.

Enquanto que a diferenciação de fibras requer a presença de diversos hormônios, em particular IAA em conjunto com GA (ALONI, 1987; DIGBY; WAREING, 1966; LEV-YADUN, 2000; RIDOUTT; PHARIS; SANDS, 1996; SAVIDGE, 2000), os elementos de vaso parecem se diferenciar com base em um sinal de IAA apenas, com o desenvolvimento de vasos particularmente sensíveis ao abastecimento de IAA (DOLEY; LEYTON, 1968; JUNGHANS et al., 2004). Já o parênquima radial parece ser principalmente regulado pelo etileno (LEV-YADUN; ALONI, 1995).

Quando ambos GA e IAA exógenos foram aplicados em caules nos quais as folhas haviam sido excisadas, concentrações elevadas de IAA estimularam diferenciação rápida de fibras curtas, enquanto que altos níveis de

GA resultaram em fibras longas (ALONI, 1979; ROBERTS; GAHAN; ALONI, 1988). Em álamos transgênicos com super produção de GA20ox (enzima que impede oxidação da GA o que resulta em aumento em seu nível) foram observados aumentos tanto do crescimento do xilema como no comprimento de suas fibras (ERIKSSON et al., 2000). Ridoutt, Pharis e Sands (1996) estudando *Eucalyptus globulus* observaram as influências de um inibidor da biossíntese de GA (Trinexapac-etil) no desenvolvimento de fibras do xilema secundário. Os resultados mostraram que o alongamento (crescimento) das fibras do xilema secundário em *Eucalyptus globulus* é dependente do nível de GA na região cambial; níveis mais elevados de Trinexapac-etil resultaram em fibras mais curtas.

Com base na análise de seções tangenciais do câmbio vascular e regiões adjacentes em árvores de álamo, Israelsson, Sundberg e Moritz (2005) relataram que os bioativos GA₁ e GA₄ estavam localizados principalmente na zona de expansão radial das células do xilema. Esses autores sugeriram que o principal papel da GA durante o desenvolvimento do xilema é regular estágios iniciais de sua diferenciação, incluindo alongamento (crescimento) celular. Um estudo com uma variedade de ervilhas geneticamente anãs convincentemente demonstrou que GA juntamente com brassinosteróides (BR) desempenham importante papel no controle do alongamento de células do caule, mas de uma forma mais limitada que a resposta à auxina (YANG; DAVIES; REID, 1996).

Segundo Cleland (2010) a relação entre IAA, GA e BR no controle do alongamento das células do caule poderia ser explicada pelo BR e o GA atuando como fatores permissivos, ao invés de fatores regulatórios na expansão (elongation) das células. Isto significa que eles devem estar presentes para a auxina promover a expansão das células, mas que as variações na taxa de expansão das células ao longo do caule não seriam devido a variações nas concentrações dos hormônios GA e BR. Existem evidências de que em caules

deficientes de BR o limiar de rendimento é aumentado de modo que existe insuficiente P-Y (P é a pressão de turgescência e Y é o limiar de rendimento da parede) para permitir que o afrouxamento da parede ocorra (BEHRINGER et al., 1990). Da mesma forma, GA pode ser necessária para manter as células do caule num estado que lhes permite responder para a auxina (CLELAND, 2010).

Diversos trabalhos com intuito de elucidar se IAA e GA atuam de forma independente ou em sinergia têm sido realizados com espécies herbáceas. Mutantes deficientes em GA ou IAA demonstraram que ambos os hormônios podem estimular de forma independente o alongamento do entrenó de ervilha e hipocótilos de *Arabidopsis* (BARRATT; DAVIES, 1997; COLLETT; HARBERD; LEYSER, 2000; YANG; DAVIES; REID, 1996). A possibilidade de que GA e IAA promovam independentemente a expansão das células caulinares é fortemente apoiada pelos dados de Yang, Davies e Reid (1996), que mostraram que a adição de IAA e GA promoveu o crescimento de caules de ervilha em diferentes áreas. Como exemplo, os autores citaram que as células caulinares podem primariamente ser controladas pela GA, enquanto IAA pode desempenhar um papel secundário, mas essencial na promoção da biossíntese de GA. Mas à medida que as células aumentam e amadurecem, o controle da expansão celular pode mudar para um controle inteiramente mediado por IAA (YANG; DAVIES; REID, 1996). BR pode ser um fator permissivo que é essencial para o alongamento das células caulinares em ambas as fases imaturas e maduras (CLELAND, 2010). Para Ross et al. (2000), Wolbang et al. (2004) e Wolbang e Ross (2001) é evidente que, na planta intacta, IAA e GA atuam em sinergia uma vez que a estimulação dos genes da biossíntese de GA, GA20ox e GA3ox ocorre por intermédio da IAA.

O crescimento celular (elongation) é mediado pela ação dos hormônios no afrouxamento da parede celular. O processo de expansão é explicado pela hipótese, amplamente aceita, de crescimento ácido, a qual hipotetiza que a IAA

acidifica a região da parede celular, estimulando a célula em questão a secretar prótons, o que promove a redução do pH extracelular, que por sua vez, aumenta a atividade das proteínas da parede celular, chamadas expansinas (COSGROVE, 1997). A relação entre expansinas, crescimento ácido e auxina foi sugerida por diversas experiências, sugerindo assim que a auxina e expansinas estimulam a expansão das células através de uma via comum (COSGROVE et al., 2002). Adicionalmente estudos sugerem que GA também desempenha papel importante no processo de expansão celular. Esses sugerem que o crescimento celular induzido pelo GA é mediado, em parte, através da ação da *xyloglucano endotransglicosidases-hidrolase* (XETs) juntamente a expansinas que atuam sobre o afrouxamento da parede celular (NISHITANI, 1997).

Acredita-se que as enzimas XETs, as quais têm sua produção estimulada pela GA, aumentam a plasticidade da parede celular pela reorganização do xiloglucano através de clivagem e re-ligação de polímeros de xiloglucano na parede celular; enquanto que as proteínas expansinas agiriam na perturbação à adesão do polissacarídeo (COSGROVE, 2000; NISHITANI, 1997). Segundo Taiz e Zeiger (2006) as expansinas causam o afrouxamento da parede por atuarem na ruptura das pontes de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e as hemicelulose, enquanto que IAA e GA agem na quebra das cadeias de hemicelulose. Segundo os mesmos autores outra possibilidade da ação da GA seria a ativação da síntese da enzima α -amilase, que promove a diminuição do potencial osmótico celular através da formação de glicose a partir do amido.

Simultaneamente ao afrouxamento da parede celular, o protoplasma absorve água, o que permite a expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2006). Assim, o potencial de água no xilema também é determinante no crescimento celular potencial na zona cambial e zona de células em alargamento (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997; KRAMER, 1987). O turgor celular ou a plasticidade da parede é diferencialmente regulado entre os vasos e as fibras (MELLEROWICZ

et al., 2001). Os vasos crescem muito mais nos sentidos radial e tangencial, enquanto que as fibras sofrem um aumento maior no seu comprimento (WENHAM; CUSICK, 1975). A maior capacidade dos vasos em gerar turgescência de crescimento quando comparado às fibras, ou é devido à expressão aquaporina (DEBOER; VOLKOV, 2003; DREW et al., 2010; LUU; MAUREL, 2005; VERA-ESTRELLA et al., 2004) ou é devido às diferenças na atividade dos vacúolos (AREND; FROMM, 2003; DREW et al., 2010).

2.3.3 Espessamento e lignificação da parede celular

A formação da parede celular e lignificação ocorrem no final do desenvolvimento celular quando ambas as concentrações de IAA e GA são relativamente baixas e estáveis (ISRAELSSON; SUNDBERG; MORITZ, 2005; TUOMINEN et al., 1997; UGGLA et al., 1996; UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998). No final desses processos, células individuais ativam um programa de senescência intrínseco denominado morte celular programada (PCD – programmed cell death). Muito pouco é conhecido sobre a PCD em plantas (PENNEL; LAMB, 1997). Segundo Taiz e Zeiger (2006), a PCD dos elementos traqueais parece ocorrer durante a diferenciação, na qual os núcleos e a cromatina se degradam e o citoplasma desaparece como resultado da ativação de genes que codificam nucleases e proteases.

O aparecimento do espessamento secundário na parede celular restringe completamente o crescimento celular (ABE et al., 1997, 2003), fazendo com que o crescimento das células cesse. Para o espessamento secundário é necessária a reorganização das microfibrilas, e esta reorganização precisa de Ca^{2+} e fotossintatos que parecem ser os fatores mais limitantes (KELLER, 1978; LARSON, 1969; RICHARDSON, 1964 citados por DELEUZE; HOULLIER, 1998). Por exemplo, um aumento do dióxido de carbono aumenta a

disponibilidade de fotossintatos e proporciona um aumento na espessura da parede (CONROY et al., 1990 citados por DELEUZE; HOULLIER, 1998).

Os hormônios também desempenham papel fundamental no espessamento da parede celular. Quando GA e IAA exógeno foram aplicados em caules cujas folhas haviam sido excisadas, concentração elevada de IAA estimulou a formação de fibras com paredes secundárias espessas, enquanto que altos níveis de GA resultaram em fibras com paredes secundárias delgadas (ALONI, 1979; ROBERTS, 1988). De acordo com Wodzicki e Wodzicki (1980) há uma acumulação gradual do ácido abscísico na zona cambial e no floema mais jovem da região basal do caule de *Pinus silvestris*, ao fim de uma estação de crescimento. O aumento de ácido abscísico pode até mesmo inibir o fluxo polar da auxina e como resultado, induzir o aumento da espessura da parede de traqueídeos durante a formação de lenho tardio em conífera (ROBERTS, 1988). Além disso, aplicação de etileno aumentou a espessura da parede celular em experimento realizado por Junghans et al. (2004). Há também indicações de que as aplicações de etileno aumentam a deposição de celulose nos caules de mudas de *Picea abies* (INGEMARSON; EKLUND; ELIASSON, 1991).

Conforme demonstrado por Björklund et al. (2007), todos os genes da biossíntese da lignina (exceto PttC4H2 e PttHCT2) foram fortemente induzidos por IAA. Desta forma, os autores atribuíram a lignificação retardada de fibras do xilema nas árvores tratadas com IAA ao baixo fornecimento de auxina durante o curso da experiência. Esta noção é igualmente suportada pela ausência de lignificação relatada em paredes secundárias de fibras de mutantes deficientes no transporte polar de auxina (LEV-YADUN; WYATT; FLAISHMAN, 2004; ZHONG; YE, 2001). Estudo com *Eucalyptus urophylla* demonstrou que quando foram utilizadas aplicações exógenas de ácido 2,4-diclorofenóxicácético (auxina sintética) e ácido jasmônico ocorreu aumento no teor de lignina (MONTEIRO, 2005) e estudo com *Eucalyptus grandis* quando foram utilizadas

aplicações exógenas de ácido giberélico e citocinina (BAP) ocorreu redução do teor de lignina (PEREIRA, 2005).

Embora GA não induza lignificação na ausência de auxina, tem sido sugerido que GA pode modificar a relação siringil/guaiacil (S/G), tal como deduzido em *Coleus* spp. (ALONI; TOLLIER; MONTIES, 1990) e em árvores com supra-produção de GA (ISRAELSSON et al., 2003). No entanto, Björklund et al. (2007) demonstraram que todos os genes ligados à síntese de lignina induzidos por GA foram ainda mais fortemente induzidos pela IAA. Segundo os mesmos autores, é possível que as modificações de lignina observadas por Israelsson et al. (2003) em árvores com supra-produção de GA tenham sido indiretamente causadas pelo aumento dos níveis de auxina nessas árvores.

2.4 Regulação de dimensões e frequência celular por gradiente hormonal

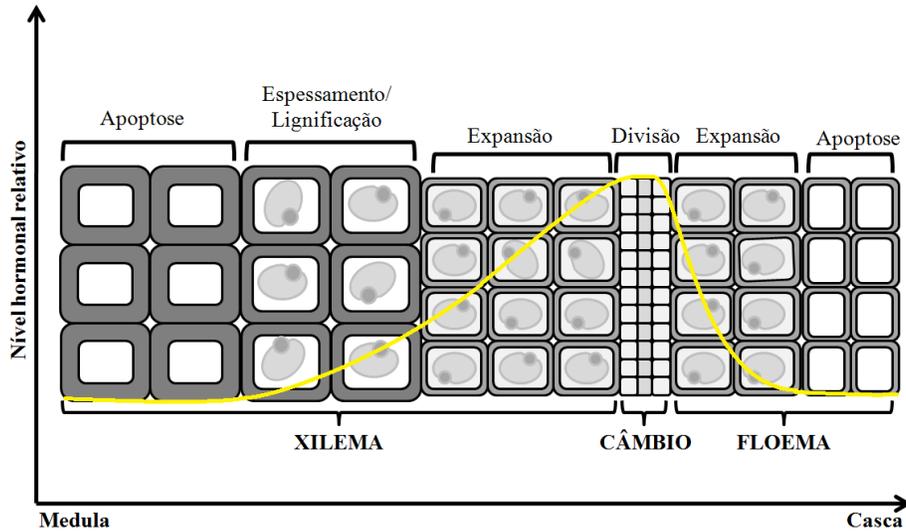
Uma série de experimentos com mudas de ervilha forneceram evidências apoiando a hipótese de que a canalização do fluxo de auxina determina o padrão ordenado dos tecidos vasculares das folhas para as raízes (SACHS, 1981). De acordo com esta hipótese, o fluxo de IAA, que começa por difusão, induz um sistema de transporte polar de IAA, que promove sua movimentação e leva à canalização do fluxo de IAA ao longo de uma estreita “série” de células. Evidências moleculares recentes suportam a hipótese de canalização demonstrando que o rearranjo do fluxo polar de IAA muda a polaridade do tecido através da modificação do sítio da proteína PIN (um componente essencial envolvido no efluxo da IAA) na membrana plasmática (SAUER et al., 2006) como foi previsto pela hipótese de canalização.

A regulação de padrões determinada pelo fluxo de IAA renovou o debate sobre um possível papel da auxina como um morfógeno (SABATINI et al., 1999). Segundo Morris, Friml e Zažímalová (2010) do ponto de vista dos animais, a definição rigorosa de um morfógeno exige: (a) a formação de um

gradiente de concentração estável do composto em questão; (b) que o composto em si deve diretamente "instruir" a resposta das células (e não funcionar através de outra via de sinalização); e (c) que a magnitude da resposta (de uma célula) deve depender da concentração do morfógeno. Evidências estão se acumulando, embora principalmente indireta, para demonstrar as ações da IAA em algumas dessas propriedades.

Medições da concentração de IAA por espectrometria de massa de alta sensibilidade em criosecções tangenciais de 30 μm obtidas na zona cambial e tecidos adjacentes de *Pinus sylvestris* L. e *Populus tremula* L. x *Tremuloides Michx* revelaram gradientes de concentração que partilham características dos campos morfogenéticos encontrados em sistemas animais (TUOMINEN et al., 1997; UGGLA et al., 1996). Ambas as espécies exibiram uma elevada concentração de IAA na zona cambial e seus derivados mais recentes. A partir do valor de pico, a concentração diminuiu em direção do floema e xilema, atingindo níveis baixos e relativamente estáveis perto da transição entre a zona de expansão celular e a zona de deposição da parede celular secundária (UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998). As derivadas cambiais são, portanto, expostas a um campo estável de diminuição da concentração de IAA durante o seu desenvolvimento em células de xilema e floema, conforme pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Gradiente radial de concentração de IAA na zona cambial e tecidos adjacentes.



Fonte: Adaptado de Uggla et al. (1996, 1998).

Uggla, Mellerowicz e Sundberg (1998) demonstraram que além de gradientes radiais de concentração de IAA, árvores de *Pinus* também possuem gradiente longitudinal de concentração de IAA, com este último apresentando concentrações máximas próximas ao broto apical e diminuição gradativa em direção às raízes. As descobertas de Tuominen et al. (1997), Uggla et al. (1996) e Uggla, Mellerowicz e Sundberg (1998) confirmam que o transporte de auxina polar contínuo através das células meristemáticas ou parenquimáticas induz a uma série complexa de eventos que resultam na formação de uma “faixa-cordão” vascular e finalmente no padrão ordenado contínuo a partir das margens das folhas até a extremidade das raízes (SORCE et al., 2013). Isto sugere que a diferenciação vascular pode ser vista como uma expressão anatômica do fluxo de auxina (SACHS, 1981, 2000).

O modelo emergente de atividade cambial regulada pelo transporte polar de gradientes de auxina difere da visão clássica de morfógenos de animais, que é

supostamente livre para difundir-se a partir de uma fonte localizada. Interessantemente, também no campo animal, o conceito de morfógeno está sendo revisto, uma vez que os gradientes de morfógenos clássicos parecem estar ativamente mantidos pelo tráfico vesicular (ENTCHEV; GONZÁLEZ-GAITÁN, 2002), mostrando assim semelhanças com o transporte polar de auxina.

Os gradientes de concentração de auxina no câmbio vascular e ao longo do eixo da planta podem, portanto, formar campos morfogenéticos que fornecem informações direcional e posicional para a diferenciação das células (ALONI; ZIMMERMAN, 1983; UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998). Neste modelo, as concentrações de auxina são convertidas em informação de posição através dos genes IAA, cujo nível de expressão é regulado por diferentes concentrações do hormônio. Conseqüentemente, a expressão de genes IAA no câmbio, onde as concentrações de auxina são elevadas, iriam contribuir para a manutenção de uma população de células do câmbio, ao passo que outros genes IAA que são expressos em concentrações mais baixas de auxina facilitariam as etapas posteriores do desenvolvimento do xilema (BHALERAO; BENNETT, 2003).

O controle das dimensões celulares será então imposto pelos gradientes hormonais. O decrescente gradiente de concentração de IAA ao longo do eixo da árvore a partir das folhas (fontes produtoras de IAA) para as raízes resulta num aumento geral e gradual nas dimensões dos traqueídeos e no diâmetro dos vasos com o aumento da distância a partir de folhas jovens (ALONI, 1987; ALONI; ZIMMERMANN, 1983; LEITCH, 2001; UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998; ZIMMERMANN, 1983). A frequência de vasos é controlada pela concentração de auxina: altas concentrações (próximo dos locais de síntese de auxina- folhas) induzem a maiores frequências, enquanto que as baixas concentrações (mais abaixo no caule - no sentido das raízes) induzem a

menores frequências, portanto, o gradiente de auxina induz à diminuição da frequência de vasos a partir das folhas para as raízes (ALONI, 2001). Consistentemente, o aumento do diâmetro dos vasos está associado a uma diminuição na densidade de vasos, assim, menores diâmetros e maiores frequências de vasos são geralmente encontrados nos ramos, enquanto que maiores diâmetros e menores frequências de vasos são observados nas raízes (ALONI; ZIMMERMAN, 1983; LEITCH, 2001).

Altas concentrações de IAA próximas das folhas jovens induzem vasos estreitos devido à sua rápida diferenciação, permitindo apenas tempo limitado para o crescimento celular; por outro lado, baixas concentrações de IAA na parte inferior (próximo às raízes) resultam na diferenciação lenta, o que permite maior expansão das células antes da deposição da parede secundária, e desse modo, resulta em vasos largos (ALONI; ZIMMERMAN, 1983). Esta hipótese foi experimentalmente confirmada em 1983 por Aloni e Zimmerman pelo uso de várias concentrações de auxina aplicada a caules, que tiveram seus brotos apicais e folhas removidos.

Estudos utilizando plantas transgênicas com níveis alterados de IAA confirmaram as relações gerais entre a concentração de IAA e o diâmetro e frequência de vaso. Plantas com super produção de auxina (expressão do gene *iaaM* – gene pró-auxina) continha muitos mais elementos de vasos do que as plantas de controle, e os seus vasos eram estreitos (KLEE et al., 1987); por outro lado, as plantas com níveis reduzidos de auxina (expressão do gene *iaaL* - gene anti-auxina) continham menos vasos de tamanho geralmente maior (ROMANO; HEIN; KLEE, 1991).

A indução (frequência) e dimensões do parênquima radial podem ser explicadas pela “*Ethylene Aeration Hypothesis*” formulada por Lev-Yadun e Aloni em 1995. Segundo tal hipótese, a indução dos raios vasculares ocorre principalmente em função do fluxo radial de etileno, o qual é sintetizado nas

próprias células em diferenciação e que se move por centrifugação através do câmbio. Enquanto que a regulação das dimensões é também influenciada por uma diminuição nos níveis de auxina das folhas para raízes. A diminuição gradual do fluxo polar axial de auxina a partir de folhas para as raízes resulta em um aumento relativo na influência de um sinal de fluxo radial. Isso resulta em um aumento de centrífuga no tamanho do raio, de modo que as iniciais radiais ocupam, gradualmente, regiões maiores no câmbio de muitas espécies lenhosas. Explicando assim a tendência geral de aumento do tamanho do raio com o crescimento em circunferência do fuste. A hipótese sugere que o etileno influencia o início e o tamanho do raio pelo seu efeito negativo conhecido no transporte polar de auxina (LEV-YADUN; ALONI, 1995).

2.5 Aplicações comerciais de hormônios na agricultura

A descoberta dos hormônios vegetais e de sua capacidade para regular os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas foram decisivos para a horticultura, pois eles podem ser aplicados para melhorar a produtividade, a qualidade e a pós colheita (GREENE, 2010). Desta forma, seus efeitos fisiológicos têm sido estudados visando ao avanço no conhecimento da ação estimulatória ou inibitória no crescimento e desenvolvimento das plantas (MARTINS; CASTRO, 1999).

As auxinas são utilizadas comercialmente há mais de 50 anos na agricultura, na prevenção da abscisão de frutos e folhas, enraizamento de estacas para propagação vegetativa, promoção da floração, indução de partenocarpia e raleio de frutos (TAIZ; ZEIGER, 2006). Segundo estes autores, as auxinas sintéticas (ex.: 2,4-D e dicamba) são amplamente utilizadas como herbicidas que induzem à excessiva expansão celular e, na sequência, à morte da planta.

Os principais usos comerciais de GA (principalmente GA₃) estão relacionados à promoção do crescimento de frutíferas, à maltagem da cevada e

ao aumento da produção de açúcar em cana-de-açúcar (TAIZ; ZEIGER, 2006). Da mesma forma, inibidores da síntese de giberelinas são usados comercialmente para evitar o alongamento de colmos em algumas culturas. Por exemplo, para a cultura do trigo, o cloreto de cloromequat (OLUMEKUN, 1996) e o Etil-Trinexapac (ESPINDULA et al., 2009; ZAGONEL; FERNANDES, 2007) têm apresentado bons resultados na redução da estatura das plantas e de perdas por acamamento.

Há também a aplicação conjunta de dois ou mais hormônios (por exemplo: auxina, giberelina e citocinina) ou destes com outras substâncias (por exemplo: aminoácidos, nutrientes e vitaminas) em diversas culturas de interesse agrícola, são os chamados bioestimulantes, que podem ser aplicados diretamente nas plantas ou em tratamento de sementes (KLAHOLD et al., 2006). Esses biorreguladores favorecem a expressão do potencial genético das plantas mediante alterações nos processos vitais e estruturais, promovem o equilíbrio hormonal e estimulam o desenvolvimento do sistema radicular (CASTRO; VIEIRA, 2001; SILVA et al., 2008). Muitos desses produtos aumentam a absorção de água e de nutrientes pelas plantas, bem como sua resistência aos estresses hídricos e aos efeitos residuais de herbicidas no solo (VASCONCELOS, 2006). Observa-se ainda amplo uso para aumento na produção de grãos em cultura da soja (VIEIRA; CASTRO, 2001), aumento do rendimento de grãos na cultura do milho (DOURADO NETO et al., 2004) e melhoria na quantidade e qualidade de fibra em algodoeiro (ALBRECHT et al., 2009) e linhaça (AYALA-SILVA et al., 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a importância econômica que a madeira possui atualmente e nas prospecções para o futuro próximo (material renovável), é surpreendente que nossa compreensão de como a madeira se desenvolve está longe de ser concluída. Com algumas exceções, muito pouco se sabe sobre os processos celulares, moleculares e de desenvolvimento que são a base da formação da madeira.

Durante muito tempo, a compreensão do processo pelo qual o câmbio vascular produz madeira (xilogênese) progrediu muito lentamente. Houve uma extensa literatura descritiva abordando as propriedades anatômicas, químicas e físicas da madeira controladas por fatores exógenos (fotoperíodo, temperatura, água, etc), mas a compreensão dos mecanismos moleculares e fisiológicos da atividade cambial na formação da madeira não teve os mesmos avanços. Desta forma, os estudos sobre xilogênese devem agora englobar a fisiologia e a biologia molecular. Dentro desse contexto, o estudo dos hormônios vegetais e suas interações (fatores endógenos) no processo de xilogênese se faz de grande importância.

O conhecimento aprofundado da xilogênese nos conduzirá a um nível de entendimento capaz de fornecermos informações relevantes para a biotecnologia da madeira, bem como a aplicabilidade do uso exógeno de substâncias capazes de alterar o processo de xilogênese. A Tabela 1 apresenta resumidamente a influência dos hormônios IAA e GA no processo de xilogênese.

Tabela 1 - Influência dos hormônios IAA e GA no processo de xilogênese.

		Hormônio		
		IAA	GA	IAA+GA
Processos Celulares	Divisão	+	++	+++
	Destino	Vaso	Indiferenciado	Vaso e Fibra
	Expansão	+	+	+
	Espessamento	+	-	Sem referência
	Lignificação	+	-	Sem referência

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Changes in the arrangement of cellulose microfibrils associated with the cessation of cell expansion in tracheids. **Trees**, Berlin, v. 11, p. 328-332, 1997.
- ABE, H. et al. Temporal water deficit and wood formation in *Cryptomeria japonica*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, p. 859-863, 2003.
- AHMADI, A.; BAKER, D. A. Effects of abscisic acid (ABA) on grain filling processes in wheat. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 28, p. 187-197, 1999.
- ALBRECHT, A. P. et al. Aplicação de biorregulador na produtividade do algodoeiro e qualidade de fibra. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 191-198, 2009.
- ALONI, R. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 63, p. 609-614, 1979.
- ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 179-204, 1987.
- ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, p. 22-34, 2001.
- ALONI, R. The induction of vascular tissues by auxin. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 471-492.
- ALONI, R. et al. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. In: SAVIDGE, R. A.; BARNETT, J. R.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation: experimental biology reviews**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 223-236.
- ALONI, R.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, p. 1743-1747, 1990.

ALONI, R.; ZIMMERMANN, M. H. The control of vessel size and density along the plant axis: a new hypothesis. **Differentiation**, New York, v. 24, p. 203-208, 1983.

AREND, M.; FROMM, J. Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 255-264, 2003.

ASTHIR, B.; KAUR, A.; BASRA, A.S. Do phytohormones influence the uptake and metabolism of sucrose in spikelets of wheat? **Phyton**, Vicente Lopez, v. 38, p. 293-299, 1998.

ATKIN, O. K.; BOTMAN, B.; LAMBERS, H. The relationship between the relative growth rate and nitrogen economy of alpine and lowland *Poa* species. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 1324-1330, 1996.

AUSSENAC, G. Déicits hydriques et croissance des arbres forestiers. **ForêtEntreprise**, l'Avenir, v.89, p. 41-47, 1993.

AYALA-SILVA, T. et al. Effect of two growth regulators on yield and fiber quality and quantity in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Plant Growth Regulation Society of America Quarterly**, Chicago, v. 33, p. 90-100, 2005.

BARNES, P.W. et al. Plant competition for light analyzed with a multispecies canopy model: III., influence of canopy structure in mixtures and monocultures of wheat and wild oat. **Oecologia**, Berlin, v. 82, p. 560-566, 1990.

BARRATT, N. M.; DAVIES, P. J. Developmental changes in the gibberellin-induced growth response in stem segments of light-grown pea genotypes. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, p. 127-134, 1997.

BEHRINGER, F. J. et al. Physical basis for altered stem elongation rates in internode length mutants of *Pisum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, p. 166-173, 1990.

BHALERAO, R. P.; BENNETT, M. J. The case for morphogens in plants. **Nature Cell Biology**, London, v. 5, p. 939-943, Nov. 2003.

BJÖRKLUND, S. et al. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 499-511, 2007.

- BODE, J.; WILD, A. The influence of (2-chloroethyl) trimethyl ammoniumchloride (CCC) on growth and photosynthetic metabolism of young wheat plants (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 116, p. 435-446, 1984.
- BOOTH, A. et al. Effects of indolyl-3-acetic acid on the movement of nutrients within plants. **Nature**, London, v. 194, p. 204-205, 1962.
- BRENNER, M. L.; CHEIKH, N. The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 649-670.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132 p.
- CHO, H. T.; KENDE, H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1661-1671, 1997.
- CLELAND, R. E. The final action of hormones: auxin and cell elongation. In: PETER, J.; DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Ithaca: Springer, 2010. p. 204-220.
- COLLETT, C. E.; HARBERD, N. P.; LEYSER, O. Hormonal interactions in the control of arabidopsis hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 553-562, 2000.
- COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, London, v. 407, p. 321-326, 2000.
- COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible walls and cell enlargement. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1031-1041, 1997.
- COSGROVE, D. J. et al. The growing world of expansins. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 43, p. 1436-1444, 2002.
- CRAMER, M. D. et al. Reduction, assimilation and transport of N in normal and gibberellins deficient tomato plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 95, p. 347-354, 1995.

CUI, K. M.; LITTLE, C. H. A. The effects of exogenous IAA and GAs on phloem and xylem production in *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. **Chinese Journal Botany**, Beijing, v. 5, n. 1, p. 145-153, 1993.

DARUSSALAM, C. M. A.; PATRICK, J. W. Auxin control of photoassimilate transport to and within developing grains of wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 69-77, 1998.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** 2nd ed. London: Kluwer Academic, 2004. p. 1-15.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 1-12.

DEBOER, A. H.; VOLKOV, V. Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. **Plant Cell Environment**, New York, v. 26, n. 1, p. 87-101, Jan. 2003.

DELEUZE, C.; HOULLIER, F. A simple process-based xylem growth model for describing wood microdensitometric profiles. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 193, p. 99-113, 1998.

DIGBY, J.; WAREING, P. F. The effect of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. **Annals of Botany**, London, v. 30, p. 539-549, 1966.

DIJKSTRA, P.; REEGEN, H. ter; KUIPER, P. J. C. Relation between relative growth rate, endogenous gibberellins, and the response to applied gibberellic acid for *Plantago major*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 629-634, 1990.

DOLEY, D.; LEYTON, L. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of secondary xylem in *Fraxinus*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 67, p. 579-594, 1968.

DOURADO NETO, D. et al. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

DREW, D. M. et al. Process-based model of daily xylem development in Eucalyptus. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 264, n. 2, p. 395-406, May 2010.

DUNCAN, W. G. Leaf angles, leaf area and canopy photosynthesis. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 482-485, 1991.

DÜNISCH, O.; BAUCH, J. Influence of soil substrate and drought on wood formation of spruce (*Picea abies* (L.)Karst.) under controlled conditions. **Holzforschung**, Berlin, v. 48, p. 447-457, 1994.

ENTCHEV, E. V.; GONZÁLEZ-GAITÁN, M. A. Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. **Traffic**, Cambridge, v. 3, p. 98-109, 2002.

ERIKSSON, M. E. et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 784-788, 2000.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blucher, 1974. 293 p.

ESPINDULA, M. C. et al. Use of growth retardants in wheat. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 2, p. 379-387, 2009.

FABIAN, T. et al. The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 376-383, 2000.

FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. 2. ed., rev. e atual. São Paulo: E.P.U., 1985. 401 p.

FU, X.; HARBERT, N. P. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v. 421, p. 740-743, 2003.

GERSANI, M.; LIPS, S. H.; SACHS, T. The influence of shoots, roots and hormones on sucrose distribution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, p. 177-184, 1980.

GREENE, D. W. The development and use of plant bioregulators in tree fruit production. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 884, p. 31-40, 2010.

HAYAT, S. et al. Carbonic anhydrase, photosynthesis, and seed yield in mustard plants treated with phytohormones. **Photosynthetica**, Prague, v. 39, p. 111-114, 2001.

HEIDE, O. M.; BUSH, M. G.; EVANS, L. T. Interaction of photoperiod and gibberellin on growth and photosynthesis of high latitude *Poa pratensis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 65, p. 135-145, 1985.

INGEMARSON, B. S. M.; EKLUND, L.; ELIASSON, L. Ethylene effects on cambial activity and cell-wall formation in hypocotyls of *Picea abies* seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, p. 219-224, 1991.

ISHII, R. Leaf/canopy photosynthesis and crop productivity. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 215-225.

ISRAELSSON, M. et al. Changes in gene expression in the wood-forming tissue of transgenic hybrid aspen with increased secondary growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 893-903, 2003.

ISRAELSSON, M.; SUNDBERG, B.; MORITZ, T. Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, p.494-504, 2005.

JUNGHANS, U. et al. Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 1-8, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 364 p.

KAPLAN, S. L.; KOLLER, H. R. Leaf area and CO₂ exchange rate as determinants of the rate of vegetative growth in soybean plants. **Crop Science Society of America**, Madison, v. 17, p. 35-38, 1977.

KHAN, N. A. Effect of gibberellic acid on carbonic anhydrase, photosynthesis, growth and yield of mustard. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 38, p. 145-147, 1996.

KLAHOLD, C. A. et al. Resposta da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 179-185, 2006.

- KLEE, H. J. et al. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 1, p. 86-96, 1987.
- KOCH, K. E.; WU, Y.; XU, J. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 1179-1185, 1996. Special issue.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. San Diego: Academic, 1997. 454 p.
- KRAMER, P. J. The role of water in wood formation. In: SYMPOSIUM THE FORMATION OF WOOD IN FOREST TREES, 1964, New York. **Proceedings...** New York: Academic, 1964. p. 519-532.
- KRAMER, P. J. The role of water stress in tree growth. **Journal of Arboriculture**, Champaign, v. 13, n. 2, p. 33-38, february 1987.
- LALONDE, S. et al. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 37-56, 2003.
- LARSON, P. R. The indirect effect of drought on tracheid diameter in Red pine. **Forest Science**, Bethesda, v. 9, p. 41-52, 1963.
- LARSON, P. R. **The vascular cambium, development and structure**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. 725 p.
- LEITCH, M. A. Vessel-element dimensions and frequency within the most current growth increment along the length of *Eucalyptus globules* stems. **Trees**, Berlin, v. 15, p. 353-357, 2001.
- LEITCH, M. A.; SAVIDGE, R. A. Evidence for auxin regulation of bordered-pit positioning during tracheid differentiation in *Larix laricina*. **IAWA**, Leiden, v. 16, p. 289-297, 1995.
- LEV-YADUN, S. Cellular patterns in dicotyledonous woods: their regulation. In: SAVIDGE, R.; BARNETT, J. R.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 315-324.

LEV-YADUN, S.; ALONI, R. Differentiation of the ray system in woody plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 61, p. 45-84, 1995.

LEV-YADUN, S.; WYATT, S. E.; FLAISHMAN, M. A. The inflorescence stem fibers of *Arabidopsis thaliana* *revoluta* (ifl1) mutant. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, p. 301-306, 2004.

LITTLE, C. H. A.; BONGA, J. M. Rest in the cambium of *Abies balsamea*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, n. 7, p. 1723-1730, July 1974.

LITTLE, C. H. A.; SUNDBERG, B. Tracheid production in response to indol-3-acetic varies with internode age in *Pinus sylvestris* stems. **Trees**, Berlin, v. 5, p. 101-106, 1991.

LONG, S. P.; HÄLLGREN, J. E. Measurements of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory. In: HALL, D. O. et al. (Ed.). **Photosynthesis and productivity in a changing environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman and Hall, 1993. p. 129-167.

LOOMIS, R. S.; WILLAMS, W. A. Productivity and the morphology of crop stands: pattern with leaves. In: EASTIN, J. E. et al. (Ed.). **Physiological aspects of crop yield**. Madison: American Society of Agronomy, 1969. p. 27-47.

LORBIECKE, R.; SAUTER, M. Induction of cell growth and cell division in the intercalary meristem of submerged deepwater rice (*oryza Sativa* L.). **Planta**, Berlin, v. 204, p. 140-145, 1998.

LUU, D. T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 85-96, 2005.

MARTINS, M. B. G.; CASTRO, P. R. C. Reguladores vegetais e a anatomia da folha de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Ângela Gigante. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 693-703, 1999.

MELIS, A. Carbon partitioning in photosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 17, n. 3, p. 453-456, 2013.

MELLEROWICZ, E. J. et al. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, p. 239-274, 2001.

MONTEIRO, M. B. O. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e 2,4- diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.** 2005. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

MORRIS, D. A.; FRIML, J.; ZAŽÍMALOVÁ, E. The functioning of hormones in plant growth and development: the transport of auxins. In: PETER, J.; DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Ithaca: Springer, 2010. p. 451-484.

MORRIS, D. A.; FRIML, J.; ZAŽÍMALOVÁ, E. The transport of auxins. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 437-470.

MULLINS, M. G. Hormone directed transport of assimilates in decapitated internodes of *Phaseolus vulgaris* L. **Annals of Botany**, London, v. 34, p. 897-909, 1970.

NAGEL, O. W.; KONINGS, H.; LAMBERS, H. Growth rate and biomass partitioning of wild-type and low-gibberellin tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at a high and low nitrogen supply. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, p. 33-39, 2001.

NISHITANI, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. In: JEON, K. W. (Ed.). **International review of cytology: a survey of cell biology.** San Diego: Elsevier, 1997. v. 173, p. 157-206.

OLUMEKUN, V. O. An analysis of the response of winter wheat (*Triticum aestivum*) components to cycocel (Chlormequat) application. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 176, n. 3, p. 145-150, 1996.

PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1383-1400, 2001.

PAUL, M. J.; PELLNY, T. K. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 539-547, 2003.

PENNEL, R. I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1157-1168, 1997.

PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do processo de lignificação em *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) por GA₃ e BAP.** 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

POORTER, H.; REMKES, C.; LAMBERS, H. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. **Plant Physiology**, Bethesda, v.94, p. 621-627, 1990.

RIDOUTT, B. G.; PHARIS, R. P.; SANDS, R. Fibre length and gibberellins A1 and A20 are decreased in *Eucalyptus globulus* by acylcyclohexanedione injected into the stem. **Physiology Plant**, Bethesda, v. 96, p. 559-566, 1996.

ROBERTS, L. W. Hormonal aspects of vascular differentiation. In: ROBERTS, L. W.; GAHAN, P. B.; ALONI, R. (Ed.). **Vascular differentiation and plant growth regulators.** Berlin: Springer-Verlag, 1988. p. 22-38. (Springer Series in Wood Science).

ROBERTS, L. W.; GAHAN, B. P.; ALONI, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators.** Berlin: Springer-Verlag, 1988. 154 p.

ROMANO, C. P.; HEIN, M. B.; KLEE, H. J. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 438-446, 1991.

ROSS, J. J. et al. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 547-552, 2000.

SABATINI, S. et al. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. **Cell**, Cambridge, v. 99, p. 463-472, 1999.

SACHS, T. The control of patterned differentiation of vascular tissues. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 9, p. 151-262, 1981.

SACHS, T. Integrating cellular and organismal aspects of vascular differentiation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, p. 649-656, 2000.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 301-307, 2009.

SARWAT, M. et al. Phytohormones and micro RNAs as sensors and regulators of leaf senescence: assigning macro roles to small molecules. **Biotechnology Advances**, New York, v. 31, n. 8, p. 1153-1171, 2013.

SAUER, M. et al. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, p. 2902- 2911, 2006.

SAVIDGE, R. A. Intrinsic regulation of cambial growth. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, p. 52-77, 2000.

SCHIPPERS, J. H. et al. Developmental and hormonal control of leaf senescence. In: GAN, S. S. (Ed.). **Senescence processes in plants**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 145-170.

SHERIFF, D. W. Control by indole-3-acetic acid of wood production in *Pinus radiata* D. Don segments in culture. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 10, n. 2, p. 131-135, 1983.

SILVA, T. T. A. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho na presença de bioestimulantes. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 840-846, maio/jun. 2008.

SORCE, C. et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant Cell**, Rockville, v. 32, n. 6, p. 885-898, Apr. 2013.

SPONSEL, V. M.; HEDDEN, P. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 63-94.

STEEVES, T. A.; SUSSEX, I. M. **Patterns in plant development**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 388 p.

SUNDBERG, B.; UGGLA, C.; TUOMINEN, H. Cambial growth and auxin gradients. In: SAVIDGE, R.; BARNETT, J.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 169-188.

SUNDBERG, B.; TUOMINEN, H.; LITTLE, C. H. A. Effects of the indole-3-acetic acid (IAA) transport inhibitors N-1-naphthylphthalamic acid and morphactin on endogenous IAA dynamics in relation to compression Wood formation in 1-year-old *Pinus sylvestris* (L.) shoots. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 106, p. 469-476, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TEJERA, N. A. et al. Comparative analysis of physiological characteristics and yield components in sugarcane cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 102, p. 64-72, 2007.

THETFORD, M. et al. Response of *Forsythia-X intermedia Spectabilis* to uniconazole: 2., leaf and stem anatomy, chlorophyll, and photosynthesis. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Chicago, v. 120, p. 983-988, 1995.

TRAPY, F.; GUERN, J. Sensibilité a la temperature de La reponse alliauxine des cellules *Acer pseudoplatanus* cultives in vitro. **PhysiologyVegetal**, v. 18, p. 645-653, 1980.

TUOMINEN, H. et al. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, p. 577-585, 1997.

UGGLA, C. et al. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United United States of America**, Washington, v. 93, p. 9282-9286, 1996.

UGGLA, C.; MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 113-121, 1998.

VASCONCELOS, A. C. F. **Usode bioestimulantes nas culturas de milho e soja**. 2006. 112 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luíz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

VERA-ESTRELLA, R. et al. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 2318-2329, 2004.

- VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.
- WANG, R. Y.; YU, Z. W.; PAN, Q. M. Changes of endogenous plant hormone contents during grain development in wheat. **Acta Agronomy Sinica**, v. 25, p. 227-231, 1999.
- WENHAM, M. W.; CUSICK, F. The growth of secondary wood fibres. **New Phytology**, New York, v. 74, p. 247-261, 1975.
- WESTBEEK, M. H. M. et al. Analysis of differences in photosynthetic nitrogen use efficiency of alpine and lowland *Poa* species. **Oecologia**, Berlin, v. 120, p. 19-26, 1999.
- WODZICKI, T. J.; WODZICKI, A. B. Seasonal abscisic acid accumulation in the stem cambial region of *Pinus silvestris*, and its contribution to the hypothesis of a latewood control system in conifers. **Physiology Plant**, Bethesda, v. 48, p. 443-447, 1980.
- WOLBANG, C. M. et al. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, p. 769-776, 2004.
- WOLBANG, C. M.; ROSS, J. J. Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 153-157, 2001.
- YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 225-251, 2008.
- YANG, T.; DAVIES, P. J.; REID, J. B. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, p. 1029-1034, 1996.
- YAXLEY, J. R. et al. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 125, p. 627-633, 2001.
- YUAN, L.; XU, D. Q. Stimulation effect of gibberellic acid short-term treatment on leaf photosynthesis related to the increase in Rubisco content in broad bean and soybean. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 68, p. 39-47, 2001.

ZAGONEL, J.; FERNANDES, E. C. Doses e épocas de aplicação do regulador de crescimento afetando cultivares de trigo em duas doses de nitrogênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2007.

ZAJACZKOWSKY, S. Auxin stimulation of cambial activity in *Pinus sylvestris* L. the differential cambial response. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 29, p. 281-287, 1973.

ZAKRZEWSKI, J. Effect of indole-3-acetic acid (IAA) and sucrose on vessel size and density in isolated stem segments of oak (*Quercus robur*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 81, n. 2, p. 234-238, Feb. 1991.

ZAKRZEWSKI, J. Hormonal control of cambial activity and vessel differentiation in *Quercus robur*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 57, n. 4, p. 537-542, Apr. 1983.

ZHONG, R. Q.; YE, Z. H. Alteration of auxin polar transport in the *Arabidopsis* *ifl1* mutants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, p. 549-563, 2001.

ZIMMERMANN, M. H. **Xylem structure and the ascent of sap**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 283 p.

**CAPITULO 2 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO
DO XILEMA SECUNDÁRIO DE PLANTAS INTACTAS *Eucalyptus
grandis* X *Eucalyptus urophylla* TRATADAS COM HORMÔNIOS
VEGETAIS**

RESUMO

O presente capítulo visou estudar a influência da aplicação conjunta de auxina (IAA) e giberelina (GA) sobre o crescimento e desenvolvimento do xilema secundário de plantas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa controladas. As plantas foram cultivadas em vasos de 9 litros contendo a mesma mistura de substrato. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos (combinações de hormônios IAA e GA₃) foram aplicados a cada 15 dias. Avaliações de crescimento (altura, comprimentos e diâmetros) foram realizadas a cada 30 dias. No final do experimento (15 semanas após transplanto) foram realizadas medidas de trocas gasosas, massa de matéria seca dos compartimentos, área foliar e propriedades anatômicas, químicas e físicas da madeira. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e comparação das médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados analisados permitiram observar que a aplicação de IAA e GA₃ via pulverização foliar promoveu maior crescimento das plantas em altura e aumento no conteúdo de matéria seca nos compartimentos lenhosos, enquanto que a aplicação dos hormônios via sistema radicular promoveu aumento no conteúdo de matéria seca de raiz. O gradiente longitudinal de IAA é o responsável pela regulação das dimensões e frequências dos elementos anatômicos, principalmente vasos e fibras. A aplicação de IAA e GA₃ promoveu a melhoria da qualidade da madeira, promovendo aumento principalmente no comprimento das fibras. Em uma análise geral pode-se observar que os tratamentos modificaram diversos parâmetros fisiológicos alterando o desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: Auxina. Giberelina. Características da madeira.

**ANALYSIS OF THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF THE
SECONDARY XYLEM OF INTACT *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus
urophylla* PLANTS TREATED WITH PLANT HORMONES**

ABSTRACT

This chapter aimed at studying the influence of the joint application of auxin (IAA) and gibberellin (GA) over the growth and development of the secondary xylem of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* plants. The experiment was conducted in greenhouse with controlled temperature and relative humidity. The plants were cultivated in 9 L pots containing the same substrate mixture. The experimental design was completely randomized with seven treatments and five replicates. The treatments (combinations of hormones IAA and GA₃) were applied every 15 days. Growth evaluations (height, length and diameter) were conducted every 30 days. At the end of the experiment (15 weeks after transplantation), gas exchange, compartment dry matter, foliar area and anatomic, chemical and physical properties of the wood were evaluated. The results obtained were submitted to analysis of variance (F test) and the means were compared by the Tukey test at 5% pf probability. The analyzed results allowed us to verify that the application of IAA and GA₃ via foliar pulverization promoted greater plant growth in height, and increase in the content of wood compartment dry matter, while the application of the hormones via root system promoted increase in the content o root dry matter. The longitudinal gradient of IAA is responsible for the regulation of the dimensions and frequencies of the anatomic elements, especially vessels and fibers. The application of IAA and GA₃ improved wood quality, increasing, especially, the length of the wood fibers. In general, we verify that the treatment changed many physiological parameters, altering plant development.

Keywords: Auxin. Gibberellin. Wood traits.

1 INTRODUÇÃO

A análise de crescimento baseia-se, fundamentalmente, no fato de que cerca de 90%, em média, da matéria seca acumulada pelas plantas ao longo do seu crescimento são resultado da atividade fotossintética. Apesar da complexidade que envolve o crescimento das espécies vegetais, a análise de crescimento é um meio bastante preciso para mensurar a contribuição de diferentes processos fisiológicos sobre o comportamento vegetal (BENICASA, 2003).

Segundo Assis (2015), comparativamente ao potencial de produtividade das florestas plantadas do gênero *Eucalyptus*, cujo grande salto já foi dado, mais do que dobrando nos últimos 20 anos, pode-se afirmar que o grande salto de qualidade da madeira ainda está por acontecer. Esta deverá ser a próxima conquista dos programas de melhoramento genético para produção de celulose de fibra curta no Brasil e talvez sua maior contribuição para o fortalecimento da indústria brasileira desse setor. Da mesma forma, há necessidade de melhoria na qualidade da madeira para as demais indústrias de base florestal.

Apesar da herdabilidade para características tecnológicas da madeira e da polpa ser de média a alta magnitude (DEMUNER; BERTOLUCCI, 1993), os limites da variabilidade verificados nas espécies tradicionalmente plantadas no Brasil tornam-se um empecilho à obtenção de indivíduos que otimizem as características desejadas e que sejam capazes de promover saltos quantitativos e qualitativos na performance da indústria de celulose e papel (ASSIS, 2015). Desta forma, o processo de melhoramento torna-se moroso e de alto custo, fazendo da manipulação química (aplicação exógena de hormônios vegetais) uma alternativa atraente para melhorar as características qualitativas e quantitativas da madeira.

Os efeitos biológicos da aplicação exógena de hormônios vegetais em associação ou não com outras substâncias em plantas de interesse agrônomico

têm recebido muita atenção devido ao seu importante uso na agricultura; em particular, a aplicação econômica de hormônios vegetais para aumentar a produtividade de soja (VIEIRA; CASTRO, 2001) e milho (DOURADO NETO et al., 2004), melhorar o rendimento e resistência de fibras de algodão (COPUR et al., 2010) e outros indicadores de crescimento e desenvolvimento de plantas agrônômicas (TAIZ; ZEIGER, 2006) estão consolidados. Porém, poucos estudos apontam a ação dessas substâncias na produtividade e qualidade do fuste, principalmente para madeira de árvores do gênero *Eucalyptus*. Portanto, são justificáveis os esforços na busca de substâncias ativas que possam aumentar a produção desta espécie vegetal, visando, principalmente à melhoria da qualidade da madeira e ao aumento no crescimento.

Diversos hormônios estão envolvidos no processo de xilogênese, no entanto, as giberelinas (GA) e auxinas (IAA) parecem ser as que desempenham papel mais proeminente. Isso tem sido fundamentado, com base na capacidade da giberelina em associação com a auxina para induzir a formação de uma mistura de fibras e vasos, e IAA sozinho induzir apenas vasos, sendo assim a GA um fator essencial para a indução de fibras (ALONI et al., 2000). Quando GA foi aplicado isoladamente, foi observada apenas a divisão celular cambial, mas não a xilogênese (BJÖRKLUND, 2007), evidenciando assim o papel da IAA em estimular a diferenciação das células derivadas do xilema, conforme proposto por Wareing, Hanney e Digby (1964).

O objetivo deste capítulo foi investigar os efeitos da aplicação exógena de combinações de giberelina e auxina sobre o crescimento e as características anatômicas, físicas e químicas do xilema secundário de mudas de um híbrido clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Plantas do híbrido clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* foram usadas no experimento. As mudas do clone em questão foram cedidas pelo viveiro Flora Canaã, localizado no município de Artur Nogueira – SP.

No dia 17 de junho de 2015 mudas com 60 dias contendo 5 pares de folhas e altura média de 22,30 cm, foram transplantadas individualmente para vasos de 9 litros contendo a mesma mistura de substrato (2 partes de latossolo vermelho de textura média e 1 parte de esterco bovino curtido). Em 16 de julho (30 dias pós o transplanto) ocorreu a primeira aplicação hormonal, a qual foi recorrente em intervalos de 15 dias por 2 meses, correspondendo em um total de 5 aplicações. As plantas foram crescidas em casa de vegetação com temperatura (máxima 26°C) e umidade relativa (mínima 65%) controlada.

2.1 Manejo da irrigação

O volume de irrigação, para cada vaso, correspondeu à quantidade de água requerida para elevar a umidade, no volume de substrato contido no vaso, ao valor equivalente a 70% da condição de máxima retenção de água naquele recipiente. A máxima retenção foi alcançada adicionando-se água até a saturação do substrato, cessação do escoamento e então pesagem dos vasos com balança digital com precisão de 5g.

A irrigação foi realizada diariamente com o uso de recipiente graduado para repor, em volume, a quantidade de água perdida por evapotranspiração, que foi constatada através da diferença da massa do vaso em sua condição de 70% da capacidade de máxima retenção e a massa do vaso no dia. Ao longo do experimento, 14 vasos reservas, 2 para cada tratamento, foram coletados para obter o peso das plantas e corrigir a quantidade de água requerida.

2.2 Experimento dose-resposta a hormônios vegetais

Para verificar a sensibilidade das plantas às dosagens hormonais e à forma de aplicação, foi conduzido um experimento constituído de 6 tratamentos e 1 controle com 5 repetições para cada. A proporção de 1:10 (auxina : giberelina) foi a mesma para todos os tratamentos. A proporção entre hormônios foi escolhida baseando-se em Aloni (1985) que afirma que, em plantas intactas, as proporções de 1:5 até 1:20 (auxina : giberelina) apresentam resultados satisfatórios, sendo a proporção de 1:10 a melhor.

Para o experimento de formas de aplicação foram testadas: a) Aplicação via pulverização foliar e b) Aplicação via sistema radicular. Os hormônios foram aplicados conforme as seguintes dosagens, constituindo os tratamentos: tratamento 1 ambas as formas de aplicação (via pulverização foliar e via sistema radicular) receberam 0,03 mg de IAA/cm³ de zona cambial e 0,3 mg de GA/cm³ de zona cambial; o tratamento 2 recebeu o dobro da dosagem do tratamento 1 e o tratamento 3 recebeu o quádruplo da dosagem do tratamento 1.

2.3 Padrão de crescimento da planta

Para estudar o padrão de crescimento da parte aérea, as plantas foram medidas mensalmente a partir do transplantio, com auxílio de um paquímetro digital e uma trena, até o 106º dia (15 semanas).

Relativo ao caule foram mensurados a distância entrenós, altura total, diâmetro do coleto, diâmetro a 10 cm, a 15 cm, a 25 cm, a 35 cm e assim, sucessivamente, até a altura total. Para os galhos mediu-se o comprimento total, o diâmetro na intersecção com o fuste, a 10cm, a 15 cm, a 25 cm, a 35 cm e assim, sucessivamente, até o comprimento total.

Mensurações de espessura de casca foram realizadas somente uma vez no final do experimento. Para tal, confeccionaram-se cortes transversais à mão livre com o auxílio de um bisturi a partir de segmentos de caule obtidos a 10%

da altura total da planta. As mensurações de espessura da casca foram realizadas sob microscópio de luz utilizando o programa Axiovision 4.5.

O volume do fuste foi obtido pelo método de Smalian por meio da Equação 1.

$$V = L * \frac{(g_1 + g_2)}{2} \quad (1)$$

Em que:

V = Volume do torete (cm³);

L = Comprimento do torete (cm);

g₁ = área seccional da extremidade inferior do torete (cm³);

g₂ = área seccional da extremidade superior do torete (cm³).

O volume da ponta (V_{ponta}), foi calculado como um cone, utilizando a Equação 2.

$$V_{ponta} = \frac{g_1 * L}{3} \quad (2)$$

O somatório dos volumes de cada torete que formam o fuste propiciou o volume total do mesmo.

O fator de forma foi obtido pela razão entre o volume total do fuste (calculado pelo método de Smalian) e o volume total do fuste considerando o mesmo de um cilindro.

2.4 Avaliações fisiológicas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas utilizando-se o analisador de gás por infravermelho (LI-6400XT Portable Photosynthesis

System, LI-COR, Lincoln, USA) em folhas completamente expandidas, no 3° ou 4° par de folhas. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A), déficit de pressão de vapor com base na temperatura da folha (VpdL), concentração intercelular de CO₂ (Ci), concentração atmosférica de CO₂ (Ca), condutância estomática (gs) e transpiração (E). A eficiência de carboxilação (CE) e a eficiência instantânea do uso da água (EUA) foram obtidas pelas relações A/Ci e A/E, respectivamente. As avaliações foram realizadas entre 9 e 10 horas (horário solar). Utilizou-se fonte artificial de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) em câmara fechada fixada em 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Blue + Red LED LI-6400-02B, LI-COR, Lincoln, USA). A taxa de assimilação de CO₂ na câmara foi medida com a concentração ambiente de CO₂ que foi de $422,9 \pm 9,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

2.5 Determinação de massa seca

A massa seca (biomassa) dos componentes das plantas foi obtida de forma destrutiva no final do experimento. Todas as plantas foram abatidas e os componentes da copa (galhos e folhas), fuste e raiz foram separados. Todos os componentes, separadamente, foram levados à estufa de circulação e renovação forçada de ar. Fuste, galhos e raízes foram secos a $75 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto que para folhas utilizou-se a temperatura de $65 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ até peso constante.

2.6 Determinação do índice de área foliar (IAF)

O IAF foi determinado utilizando-se a planta média de cada tratamento. Todas as folhas foram removidas e uma amostra de 5 folhas completamente expandidas foi retirada. As amostras foram digitalizadas em scanner de mesa em uma resolução de 300 dpi e processadas pelo software ImageJ, obtendo-se a área foliar das amostras. As amostras de folhas foram levadas à estufa de circulação e renovação forçada de ar, à temperatura de $65 \text{ }^\circ\text{C}$, até atingirem massa constante, com posterior determinação da massa seca em balança de precisão (0,001 g).

O IAF, por tratamento, foi determinado pela Equação 3.

$$\text{Índice de Área Foliar} = \frac{\left(\frac{\text{MSFT} * \text{AFA}}{\text{MSFA}} \right)}{A} \quad (3)$$

Em que:

MSFT = Massa seca foliar total, em gramas;

AFA= Área foliar da amostra, em m²;

MSFA= Massa seca foliar da amostra, em gramas;

A= área de solo da superfície do recipiente ocupada por uma planta, em m², que neste estudo corresponde a 0,283m².

Apesar de os valores de IAF serem dependentes da área superficial do vaso, que não, necessariamente, representa a área em que uma planta de eucalipto ocuparia no campo, para este estudo, é útil para comprar as dosagens hormonais.

2.7 Determinação da densidade básica da madeira

As amostras para densidade básica da madeira foram obtidas a 10, 30 e 50% da altura da planta. Foram realizadas 3 repetições por tratamento. A densidade básica dos segmentos de caule foi então obtida de acordo com o método descrito na Norma NBR 11941 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, 2003).

2.8 Análise anatômica

As amostras para análise anatômica foram obtidas a 10, 30 e 50 % da altura da planta. Foram realizadas 3 repetições por tratamento. A mensuração de vasos e parênquima radial foi realizada a partir de fotomicrografias de secções histológicas com 18 µm de espessura no plano transversal e longitudinal

tangencial, conforme descrito por Mauri (2010). Para mensurações das fibras realizou-se a dissociação dos elementos celulares (maceração) segundo o método preconizado por Dadswell (1972). O número de células por série (linha de células) ao longo do raio transversal do caule foi computado apenas para a posição 10% da altura da planta no xilema secundário, com 3 repetições por planta. Assim, o número médio de células por série corresponde ao número médio de células que constituem o raio de xilema secundário.

As mensurações foram realizadas com auxílio do software analisador de imagem Axiovision 4.5. O número observação baseou-se na obtenção da suficiência amostral, considerando-se limite de erro de 10% e significância de 5%, conforme Equação 4.

$$n = \frac{t^2 * s^2}{E^2} \quad (4)$$

Em que:

n = número ideal de unidades amostrais

t = valor tabelado para determinado nível de significância

s² = variância da amostra piloto

E = erro, dado pela Equação 5.

$$E = LE * \bar{x} \quad (5)$$

Em que:

LE = limite de erro

\bar{x} = média

Com intuito de verificar as diferenças nas características anatômicas entre as formas de aplicação hormonal (via sistema radicular ou via pulverização

foliar) e também entre as dosagens (1, 2, 3) realizou-se a ponderação dos valores das características anatômicas obtidas nas diferentes posições do caule baseando-se no seu volume ocupado.

2.9 Composição química da madeira

As análises químicas da madeira foram realizadas a partir da homogeneização dos caules de três plantas por tratamento, sendo formada uma amostra composta por tratamento. Em seguida, este material foi moído e classificado em peneiras sobrepostas de 40 e 60 mesh. A fração utilizada foi aquela que passou pela peneira de 40 e ficou retida na de 60 mesh. Esse material foi levado para a câmara de climatização com temperatura de 20 ± 3 °C e umidade relativa de 65 ± 2 %, permanecendo nessas condições até homogeneização da umidade.

Foram determinados os teores de extrativos totais de acordo com as Normas M3/89 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL - ABTCP, 1974). O teor de lignina insolúvel (Klason) foi obtido de acordo com a metodologia proposta por Gomide e Demuner (1986) e o teor de lignina solúvel (Klason) em ácido sulfúrico foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Goldshimid (1971). O teor de lignina total foi obtido pelo somatório dos teores de lignina solúvel e insolúvel.

2.10 Análise estatística

Na análise estatística utilizou-se o programa R versão 3.3.0 (R CORE TEAM, 2016). A análise de variância (Teste F) foi realizada e, uma vez significativa, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey a 5% de significância. As pressuposições de homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos para as características estudadas foram verificadas pelos testes de Levene e de Shapiro-Wilk, a 5% de significância, respectivamente. Não houve

violação dessas pressuposições. Para análise de correlação foi utilizada a correlação linear de Pearson.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Crescimento e alterações fisiológicas das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais

Nessa seção serão apresentados os resultados e discussões referentes ao crescimento em termos volumétrico e de biomassa, trocas gasosas e alocação e partição de biomassa na planta.

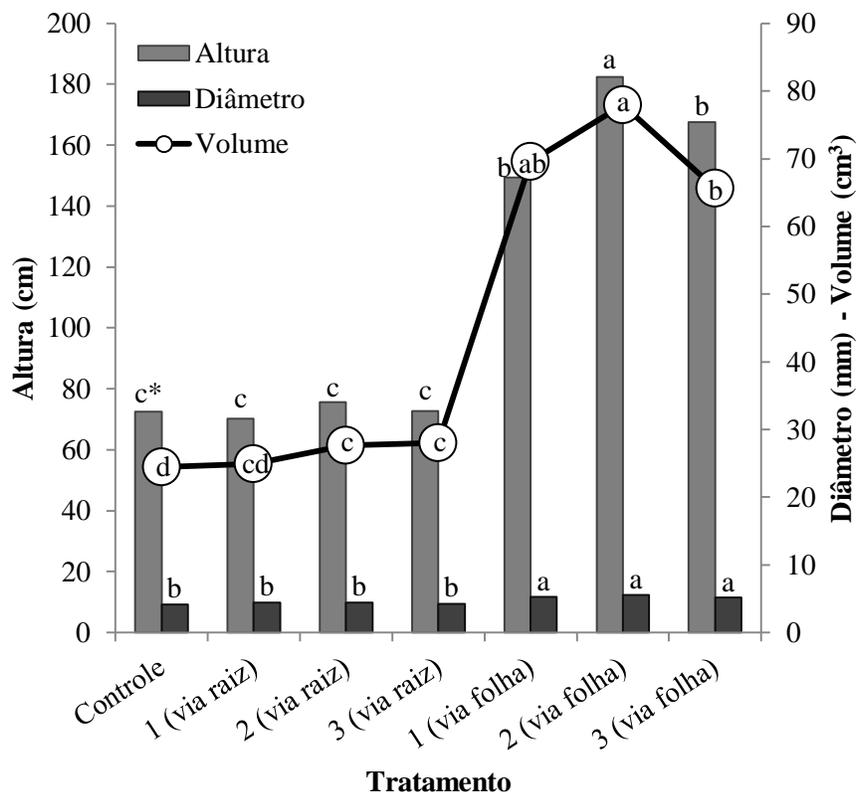
3.1.1 Análise de crescimento

Conforme apresentado no gráfico da Figura 1 os tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular não diferiram estatisticamente do controle com relação à altura e diâmetro a 10 cm de altura total, no entanto em termos de volume os tratamentos 2 e 3 se diferiram estatisticamente do controle apresentando maiores volumes. Relativo aos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar estes se diferiam estatisticamente tanto do controle como dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular apresentando maiores alturas, diâmetros a 10 cm e volume de fuste.

Observando as variações dendrométricas dentro (entre dosagens) dos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar notamos uma tendência de aumento das mesmas no tratamento com menor dosagem (tratamento 1) para o tratamento com dosagem intermediária (tratamento 2) seguido de decréscimo na maior dosagem hormonal (tratamento 3). Este comportamento também é observado nos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular, mas de uma forma menos significativa.

A correlação entre altura da planta e comprimento de fibras foi de 0,62, enquanto que a correlação entre altura da planta e distância entrenós foi de 0,99. A correlação entre diâmetro do caule a 10% e largura das fibras a 10% da altura da planta foi de 0,71, enquanto que a relação com número de células por série radial do xilema secundário foi de 0,98.

Figura 1 – Características dendrométricas por tratamento.



*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Conforme apresentado na Tabela 1 maiores valores médio para raio do caule, raio de xilema secundário, raio de medula+xilema primário e largura do câmbio vascular foram observados nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar. Esses tratamentos se diferiram tanto do controle como dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular, mas não se diferiram entre as diferentes dosagens hormonais. Desta forma, a melhor dosagem é aquela utilizada no Tratamento 1, uma vez que, com menores quantidade de hormônio obteve-se os mesmos resultados em crescimento. Relativo aos

tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular estes não se diferiram do controle e nem entre suas diferentes dosagens hormonais.

As espessuras médias de casca nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular e no tratamento controle foram estatisticamente maior que nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar. Não houve diferenciação estatística entre as dosagens hormonais em ambas as formas de aplicação dos hormônios (TABELA 1).

O número de células por série radial de xilema secundário é um reflexo da quantidade de vezes que a inicial cambial entrou em mitose. Relativo a isso, nota-se que maiores valores são observados nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar, seguidas, de uma maneira geral, das plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular e por fim pelas plantas controle (TABELA 1).

Para o fator de forma (afilamento) do caule, observam-se que apenas os tratamentos 2 e 3 com aplicação hormonal via pulverização foliar diferiram-se estatisticamente apresentando menores valores. Não houve significância estatística entre as diferentes concentrações hormonais de ambas as formas de aplicação dos hormônios (TABELA 1).

Tabela 1 - Propriedades dos tecidos constituintes do caule por tratamento.

49

Mensurações	Tratamento						
	Controle	Aplicação via raiz			Aplicação via folha		
		1	2	3	1	2	3
Raio médio do caule (μm)	4620 b*	4975 b	4938 b	4763 b	5850 a	6200 a	5713 a
Raio médio do xilema secundário (μm)	3426 b	3848 b	3775 b	3735 b	4712 a	4999 a	4636 a
Raio médio de medula + xilema primário (μm)	361 b	370 b	356 b	381 b	434 a	405 a	450 a
Largura média do cambio vascular (μm)	173 b	182 b	184 b	183 b	267 a	271 a	262 a
Espessura média de casca (μm)	524 a	521 a	577 a	530 a	443 b	486 b	399 b
Número médio de células por série do xilema secundário	208 c	238 b	241 b	209 c	286 a	330 a	288 a
Fator de forma	0,50 a	0,47 a	0,49 a	0,50 a	0,43ab	0,36 b	0,38 b

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O crescimento radial e longitudinal dos caules, neste trabalho, pode ser atribuído a um ou ambos dos seguintes fatores: a uma alteração dependente dos hormônios no número de células do xilema e uma mudança dependente dos hormônios nas dimensões individuais das células do xilema. Em geral, tem sido relatado que a aplicação exógena de GA estimula o crescimento do caule e xilogênese (BRADLEY; CRANE, 1957; MCKENZIE; DEYHOLOS, 2011; MODESTO; RODRIGUES; PINHO, 1996), mas não a expansão do floema (BRADLEY; CRANE, 1957). Estudos com aplicação de IAA exógeno também relatam o estímulo à expansão do xilema induzido por IAA (EL-SHOUBAGY; ABDEL-GHAFFAR; EL-NAGGAR, 1995; SAMANTARAI; NANDA, 1979; SNOW, 1935). Enquanto que a aplicação de ambos, GA e IAA, tem sido relatada por ter um efeito aditivo na diferenciação do xilema (BJÖRKLUND et al., 2007; DIGBY; WAREING, 1966; WAREING, 1958), o que justifica a aplicação dos dois hormônios nas plantas deste estudo.

Os resultados obtidos neste estudo (TABELA 1 e FIGURA 1) para os tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar estão em acordo com os estudos anteriormente citados, uma vez que o desenvolvimento dos tecidos xilemáticos foi favorecido, diferentemente do desenvolvimento do floema. Possivelmente o transporte de IAA ocorreu via rota interna, descendo pelo câmbio vascular, conforme observado por Aloni (2004). Quanto ao transporte de GA, apesar de pouco estudado e até mesmo controverso (DAVIES, 2004), acreditamos que seu transporte até o câmbio vascular tenha, de fato, ocorrido. Isso porque trabalhos com aplicação hormonal via pulverização foliar demonstraram que a aplicação conjunta de IAA e GA é mais eficiente em promover o desenvolvimento do xilema que quando aplicadas isoladamente (BJÖRKLUND et al., 2007; DIGBY; WAREING, 1966; WAREING, 1958), sugerindo que GA atinge o câmbio vascular quando aplicado via pulverização foliar.

Os menores volumes de caule apresentados pelo tratamento 3 com aplicação hormonal via pulverização foliar (FIGURA 1) foram, possivelmente, causados pela intoxicação à IAA, que pode pelo menos parcialmente, ser explicada pela interação (*cross-talking*) com a via biossintética do etileno (AYALA-SILVA et al., 2005; ROMANO; COOPER; KLEE, 1993), o qual inibe o alongamento de caule em muitas espécies (DAVIES, 2004).

Os tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular apresentaram valores dendrométricos menores quando comparados aos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar (FIGURA 1) e não se diferiram estatisticamente do controle com relação ao desenvolvimento dos tecidos do xilema e floema, exceto para o número de células por série radial do xilema secundário (TABELA 1). No entanto, comparados ao controle, observa-se uma tendência de maiores valores para os mesmos nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular, o que culminou com a significância estatística no volume total do caule (FIGURA 1). O reduzido número de células por série radial do xilema secundário observado para o tratamento 3 (com aplicação hormonal via raiz) pode ter sido causado por um desbalanço hormonal que acarretou em uma diminuição da divisão celular.

Como não foram encontrados estudos relatando a aplicação de IAA e GA via sistema radicular, podemos supor as seguintes explicações para os resultados encontrados nas plantas dos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular: a) a via de transporte do IAA, b) o não transporte de GA, e c) o não transporte da totalidade dos hormônios aplicados (imobilização no solo). Acreditamos que o IAA tenha sido transportado pela via não polar, em que o IAA pode se mover para cima no floema, conforme demonstrado por Aloni (2004). Esta via de transporte possivelmente foi a responsável pela tendência de maiores espessuras de casca para essas plantas quando comparadas às plantas dos tratamentos que receberam hormônios via pulverização foliar (TABELA 1),

uma vez que a proximidade do tecido à fonte do hormônio influencia no seu fornecimento (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os maiores volumes de caule observados para os tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular quando comparados ao controle e os menores volumes quando comparados as plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar (FIGURA 1) ou é devido a um transporte deficiente de GA a ponto de influenciar apenas fracamente a expansão do xilema (comparado com as plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar), ou é devido à ação solitária de IAA que, apesar de ser menos influente que em sinergismo com GA (BJÖRKLUND et al., 2007; DIGBY; WAREING, 1966; WAREING, 1958), é também capaz de estimular a expansão do xilema (EL-SHOUBAGY; ABDEL-GHAFFAR; EL-NAGGAR, 1995; LEITCH; SAVIDGE, 1995; SAMANTARAI; NANDA, 1979; SNOW, 1935). O transporte de giberelina é pouco compreendido e os estudos existentes possuem respostas divergentes ou aditivas, por exemplo, pensava-se que a giberelina fosse transportada no floema e xilema (DAVIES, 1995). No entanto, novas evidências sugerem que a biossíntese de giberelina e a sua ação ocorrem nos mesmos tecidos, e possivelmente até mesmo nas mesmas células (SPONSEL; HEDDEN, 2004). Diante do exposto e considerando as sutis variações no crescimento das plantas tratadas com hormônio via sistema radicular em comparação ao controle e das grandes variações quando comparadas às plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar (TABELA 1 e FIGURA 1), parece mais provável que nas plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular tenha havido apenas a influência do IAA no seu desenvolvimento. Dessa forma, os resultados da Tabela 1 e Figura 1 sugerem que a giberelina, em plantas intactas de *Eucalyptus*, é transportada até a zona cambial apenas quando aplicada via pulverização foliar.

A diferença observada na largura do câmbio vascular entre as formas de aplicação hormonal (TABELA 1) pode ser interpretada como um indicativo da baixa eficiência da aplicação hormonal via sistema radicular na promoção da xilogênese. A qual pode ser originada pela maior proximidade das células do floema ao IAA (TAIZ; ZEIGER, 2006), uma vez que acreditamos que o IAA tenha sido transportado até o caule via floema, conforme demonstrado por Aloni (2004); e ainda pelo não transporte de GA, conforme discutido anteriormente nesta seção.

Como a altura das plantas melhor se correlacionou com a distância entrenós ($r_{x,y} = 0,99$) e correlacionou-se fracamente com o comprimento das fibras ($r_{x,y} = 0,62$) acreditamos que, em plantas intactas de *Eucalyptus*, GA afeta fortemente a taxa de divisão das células que compõem o meristema apical. Resultados similares foram observados por Cho e Kende (1997) que estudando arroz de águas profundas, que sofre rápido alongamento do caule, após submersão, mostraram que o alongamento ocorreu através de um aumento na divisão celular do meristema intercalar. Divisão celular que foi induzida por GA na transição de G_1 para a fase S (LORBIECKE; SAUTER, 1998). Este resultado é mais uma evidência do não transporte de GA nas plantas tratadas com hormônio via sistema radicular.

O diâmetro do caule melhor se correlacionou com o número de células por série radial do xilema secundário ($r_{x,y} = 0,98$), no entanto, também apresentou uma correlação moderada com a largura das fibras ($r_{x,y} = 0,71$). Estudos de gradientes radiais de concentrações hormonais em caule de árvores têm sugerido que IAA tem maior influência na divisão celular radial e GA maior influência na expansão celular radial (ISRAELSSON et al., 2005; TUOMINEN et al., 1997; UGGLA et al., 1996; UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998). No entanto, quando GA é aplicado isoladamente observa-se divisão celular cambial (BJÖRKLUND, 2007), enquanto que o processo de expansão

celular é explicado pela hipótese, amplamente aceita, de crescimento ácido, a qual hipotetiza que a auxina desempenha papel central no processo (COSGROVE, 1997). Essas observações e outras relacionadas à ativação de genes levaram à hipotetização que o processo de expansão celular ocorre pelo sinergismo entre a auxina e a giberelina (ROSS et al., 2000; WOLBANG et al., 2004; WOLBANG; ROSS, 2001). Nosso estudo corrobora com essa hipótese, uma vez que, maiores larguras de fibras foram observadas nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar (TABELA 5). A significância estatística no número de células por série radial do xilema secundário entre os tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar e controle, e entre o controle e os tratamentos 1 e 2 com aplicação hormonal via sistema radicular, conforme apresentados na Tabela 1, em conjunto com resultados de Björklund (2007) e Cosgrove (1997) leva à especulação de que o sinergismo entre IAA e GA também pode ser verdadeiro sobre a taxa de divisão celular radial.

Menores valores de afilamento nos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar (TABELA 1) possivelmente se devem à alta taxa de divisão celular do meristema apical, conforme verificado por Cho e Kende (1997) e discutido anteriormente nesta seção para altura das plantas.

3.1.2 Trocas gasosas

Verifica-se pela Tabela 2, que os tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular diferiram estatisticamente do controle e dos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar apresentando menores taxa fotossintética líquida (A), eficiência instantânea de carboxilação (CE) e déficit de pressão de vapor com base na temperatura da folha (VpdL). Quanto à transpiração (E) e à condutância estomática (gs) apenas as plantas que receberam maior dosagem hormonal (Tratamento 3) via pulverização foliar diferiram-se estatisticamente apresentando maiores valores. Relativo à

concentração intercelular de CO₂ (C_i), independente da forma de aplicação hormonal, as plantas que receberam hormônio apresentaram maiores valores. A eficiência de uso da água (EUA) não apresentou significância estatística entre os diferentes tratamentos.

Tabela 2 – Taxa fotossintética líquida (A), eficiência instantânea de carboxilação (CE), déficit de pressão de vapor com base na temperatura da folha (VpdL), transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO₂ (Ci) e eficiência de uso da água (EUA) por tratamento.

Tratamento		A	CE	VpdL	E	gs	Ci	EUA
Aplicação via raiz	Controle	10,65 a* (1,41 / 13,24) ¹	0,03 a (0,01 / 13,74)	1,17 a (0,03 / 2,64)	3,85 b (0,67 / 16,49)	0,32 b (0,06 / 18,57)	337,88 b (6,63 / 1,96)	2,65 a (0,31 / 11,68)
	1	6,31 b (2,53 / 40,09)	0,02 b (0,01 / 36,98)	0,97 b (0,18 / 18,05)	2,94 b (1,52 / 51,30)	0,30 b (0,18 / 58,68)	364,84 a (33,88 / 9,29)	2,74 a (1,46 / 53,27)
	2	6,91 b (1,02 / 14,72)	0,02 b (0,01 / 15,09)	0,95 b (0,08 / 8,04)	4,06 b (0,75 / 17,93)	0,41 b (0,09 / 22,83)	375,12 a (5,68 / 1,51)	1,96 a (0,31 / 18,50)
	3	7,43 b (0,30 / 4,05)	0,02 b (0,01 / 5,28)	0,87 b (0,10 / 12,00)	3,19 b (0,49 / 15,32)	0,34 b (0,08 / 23,75)	364,32 a (17,51 / 4,81)	2,39 a (0,47 / 19,62)
Aplicação via folha	1	7,82 ab (1,79 / 22,94)	0,03 a (0,01 / 23,47)	1,07 a (0,10 / 9,46)	3,04 b (0,76 / 24,83)	0,26 b (0,09 / 34,45)	365,93 a (6,56 / 1,79)	2,60 a (0,39 / 14,89)
	2	9,64 ab (0,62 / 6,44)	0,03 a (0,01 / 7,86)	1,14 a (0,09 / 7,82)	3,80 b (0,81 / 21,27)	0,31 b (0,10 / 30,88)	343,39 a (15,28 / 4,49)	2,63 a (0,53 / 20,15)
	3	10,49 a (1,49 / 14,21)	0,03 a (0,01 / 15,00)	1,01 a (0,05 / 5,68)	4,63 a (0,30 / 6,47)	0,43 a (0,04 / 8,86)	359,71 a (5,91 / 1,64)	2,28 a (0,38 / 16,73)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão e coeficiente de variação (%), respectivamente.

A significativa inibição da taxa fotossintética líquida (A) apresentada pelas plantas que receberam hormônios via sistema radicular não pode, neste estudo, ser atribuída à diminuição na aquisição de CO₂ devido ao fechamento estomático como é justificado em alguns estudos (MA et al., 1997; MELONI et al., 2003; SCHMUTZ, 2000), pois não houve diferença estatística na condutância estomática (TABELA 2). Desta forma, outras limitações, não estomáticas, podem estar ocorrendo como indicado pelo aumento na concentração intercelular de CO₂ (C_i) nas plantas que receberam hormônios em comparação às plantas do tratamento controle (TABELA 2). Se C_i está alto significa que o CO₂ está chegando às células do mesófilo foliar, mas este não está sendo fixado na fase carboxilativa, possivelmente por redução na eficiência carboxilativa da rubisco (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase), culminando assim na redução da taxa fotossintética. Essa ideia é apoiada pelos resultados obtidos para a eficiência instantânea de carboxilação (CE), as quais foram menores nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular (TABELA 2), uma vez que a CE indica a capacidade de fixação de CO₂ pelo pool de enzimas (rubisco e PEPCase) (TAIZ; ZEIGER, 2006). Os ajustes internos não estomáticos mais comumente observados incluem a redução da atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin e Benson (DUA et al., 1994; KICHEVA; TSONEV; POPOVA, 1994), inibição do transporte de fotoassimilados (MASOJIDEK et al., 1991) e alterações do estoque de carboidratos nas células (QUICK et al., 1992). Os mesmos valores de condutância estomática entre as plantas do tratamento controle e as plantas dos tratamentos que receberam hormônios via sistema radicular deve-se possivelmente à redução do V_{pdL} nas plantas que receberam hormônios via sistema radicular, uma vez que tem sido observada redução na condutância estomática (g_s) sob altos valores de déficit de pressão de vapor para diversas

espécies (GUEHL; AUSSÉNAC, 1987; MACFARLANE; WHITE; ADAMS, 2004; MORECROFT; ROBERTS, 1999).

Apesar da significativa redução da taxa fotossintética líquida (A) nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular (TABELA 2), não houve alteração significativa em termos de massa seca total nessas plantas quando comparadas às plantas do tratamento controle (TABELA 4). Em um primeiro momento, poderíamos esperar uma redução em acúmulo de massa seca com a redução da taxa fotossintética, uma vez que a fotossíntese é um fator de grande importância no balanço de carbono das plantas, no entanto, essa relação não é direta. A explicação para esse resultado pode estar relacionada às melhorias na utilização de fotoassimilados pelos drenos, conforme verificado por Lawlor (1995) em plantas de programas de melhoramento genético, em que maior potencial produtivo tem apresentado melhorias relacionadas à utilização de fotoassimilados pelos drenos sem aumento da fotossíntese por unidade de área foliar. A melhor utilização de fotoassimilados pelos drenos pode ser uma consequência dos hormônios aplicados exogeneamente.

Relativo às plantas dos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar, apenas o tratamento 3 diferiu-se do tratamento controle apresentando maior condutância estomática (gs) e transpiração (E). Maior E nas plantas deste tratamento possivelmente foi responsável pelos menores valores de massa seca total (TABELA 4).

Conforme é observado na Tabela 3, a distância entrenós foi estatisticamente maior nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar, não havendo significância estatística entre as diferentes concentrações hormonais de ambas as formas de aplicação dos hormônios. Relativo ao índice de área foliar, apenas os tratamentos 2 e 3 com aplicação hormonal via pulverização foliar diferiram-se estatisticamente do controle apresentando menores valores.

Tabela 3 – Arquitetura da copa por tratamento.

Tratamento		Distância entrenó (cm)	Índice de área foliar
Controle		7,42 b* (0,87 / 11,75)	3,65 a (0,50 / 13,76)
Aplicação via raiz	1	7,07 b (0,38 / 5,39)	2,81 a (0,43 / 15,48)
	2	7,77 b (0,42 / 5,36)	3,17 a (0,62 / 19,54)
	3	6,87 b (0,34 / 4,96)	2,93 a (0,49 / 16,69)
Aplicação via folha	1	11,04 a (0,91 / 8,26)	3,05 a (0,33 / 10,99)
	2	12,84 a (0,52 / 4,04)	2,20 b (0,42 / 19,10)
	3	11,55 a (0,59 / 5,13)	2,03 b (0,30 / 14,54)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão(cm; adimensional) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

As maiores distâncias entrenós nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar devem-se à alta taxa de divisão celular do meristema apical promovido pela GA, conforme verificado por Cho e Kende (1997) e discutido na seção 3.1.1 para altura das plantas.

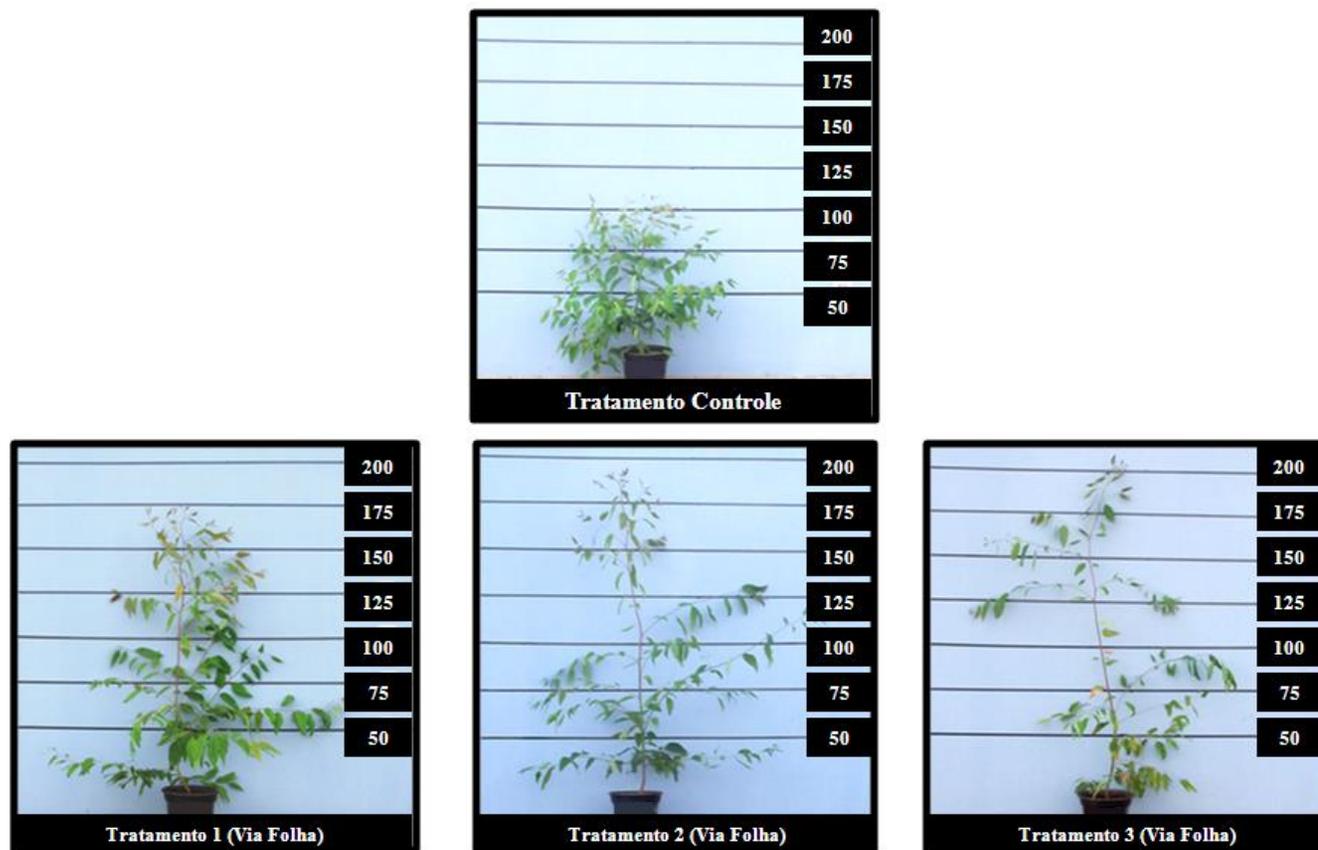
Massa seca total significativamente maior nas plantas do tratamento 1 (TABELA 4), que receberam hormônios via pulverização foliar, pode ser explicada pela melhoria na utilização de fotoassimilados pelos drenos, conforme verificado por Lawlor (1995) e Long (2006) aliado ao índice de área foliar (IAF) estatisticamente igual e distância entrenós significativamente maiores que o controle (TABELA 3). Maiores distâncias entrenós podem promover melhoria na eficiência de interceptação de luz, uma vez que quanto maior a distância

entrenós menores são as chances de auto sombreamento nas folhas inferiores, conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Aparência das plantas tratadas com diferentes concentrações hormonais, 106 dias após o plantio (continua).



Figura 2 – Aparência das plantas tratadas com diferentes concentrações hormonais, 106 dias após o plantio (conclusão).



A distância entrenós além de afetar na interceptação de luz também é um fator importante na qualidade da madeira, uma vez que determinará a quantidade de nós. O nó é considerado o defeito mais determinante para a classificação da qualidade da madeira (VIEIRA et al., 2010). Por isso, maior distância entrenós é desejável por reduzir a sua quantidade na madeira. A desrama artificial, por ser uma atividade de alto custo, somente é utilizada quando o rendimento do talhão compensa os custos operacionais (MONTAGU; KEARNEY; SMITH, 2003). Desta forma, alterações no espaçamento do plantio é a técnica silvicultural mais empregada para redução da incidência de nós (GOULART et al., 2003). Mas, como árvores com maiores diâmetros, principalmente para a indústria de madeira sólida, também são requisitos para a qualidade da madeira e como tais características são obtidas de maneira antagônica, a aplicação de espaçamento intermediário é recomendada como a melhor forma de atender a ambos (SANQUETTA et al., 2003). O uso de hormônios pode ser uma alternativa à desrama artificial na melhoria da qualidade da madeira, uma vez que baixa dosagem (tratamento 1 com aplicação hormonal via pulverização foliar) aumentou o diâmetro do fuste sem grandes perdas no afileamento (FIGURA 1 e TABELA 1).

3.1.3 Alocação e partição de biomassa

Como os fotoassimilados constituem mais de 90% da massa seca da planta (LALONDE et al., 2003) quando mensuramos a massa seca (biomassa) dos compartimentos das plantas estamos mensurando a partição de fotoassimilados.

Conforme apresentado na Tabela 4, os tratamentos que receberam hormônios via sistema radicular não diferiram estatisticamente do controle com relação à produção de massa seca nos compartimentos fuste (lenho+casca), folhas e galho. Diferença estatística foi observada somente para o

compartimento raiz, em que maiores valores foram observados no tratamento 2. Vale ressaltar que apesar de não significativa há uma tendência de menores valores de massa seca serem observados no tratamento 3, o que culminou em menores valores de massa seca total para o referido tratamento.

Relativo aos tratamentos que receberam hormônios via pulverização foliar, observa-se que para os compartimentos galhos e raízes, apenas houve diferenciação estatística para o tratamento 3. No entanto, observa-se uma clara redução da massa seca desses compartimentos com o aumento da dosagem hormonal. Tal tendência fica evidenciada no comportamento do compartimento folha e na massa seca total. Relativo ao acúmulo de massa seca no fuste, nota-se diferença estatística entre todos os tratamentos, em que maiores valores de massa seca são observados para o tratamento 2 e menores valores para o tratamento 3 (TABELA 4).

A aplicação hormonal via raízes propiciou maior acúmulo de massa seca no compartimento raiz, enquanto que a aplicação via pulverização foliar induziu o acúmulo de massa seca nos compartimentos lenhosos (Fuste + Galhos). Maior acúmulo de massa seca total foi encontrado no tratamento 1 com aplicação hormonal via folha (TABELA 4).

Tabela 4 – Produção de massa seca por compartimento da planta por tratamento.

		Massa seca média por planta (g)				
Tratamento		Compartimentos				
		Fuste	Folhas	Galhos	Raiz	Total
	Controle	12,20 d* (0,67 / 5,52) ¹	61,42 a (5,22 / 8,50)	17,54 b (1,18 / 6,72)	21,05 b (2,05 / 9,72)	112,22 b (4,23 / 3,77)
Aplicação via raiz	1	10,97 d (0,93 / 8,45)	53,58 a (4,81 / 8,98)	17,17 b (2,95 / 17,15)	21,31 b (2,74 / 12,85)	103,03 b (6,61 / 6,41)
	2	13,19 d (1,54 / 11,64)	52,42 a (11,21 / 12,38)	17,68 b (2,27 / 12,82)	27,70 a (0,93 / 3,34)	111,00 b (12,39 / 11,17)
	3	12,22 d (0,6 / 4,94)	44,78 a (8,9 / 15,88)	14,86 b (1,73 / 11,66)	20,03 b (2,71 / 13,52)	91,89 bc (11,90 / 12,95)
Aplicação via folha	1	31,61 b (0,96 / 3,03)	52,12 a (6,96 / 13,35)	27,06 a (3,24 / 11,97)	21,89 b (2,9 / 13,26)	132,68 a (7,89 / 5,95)
	2	37,21 a (3,94 / 10,60)	35,28 ab (7,58 / 15,49)	23,04 a (1,76 / 7,64)	19,64 b (1,98 / 10,11)	115,16 b (10,53 / 9,39)
	3	26,28 c (1,53 / 5,81)	23,68 b (4,03 / 16,01)	13,70 b (2,53 / 18,49)	10,76 c (1,29 / 11,95)	74,42 c (6,54 / 8,79)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

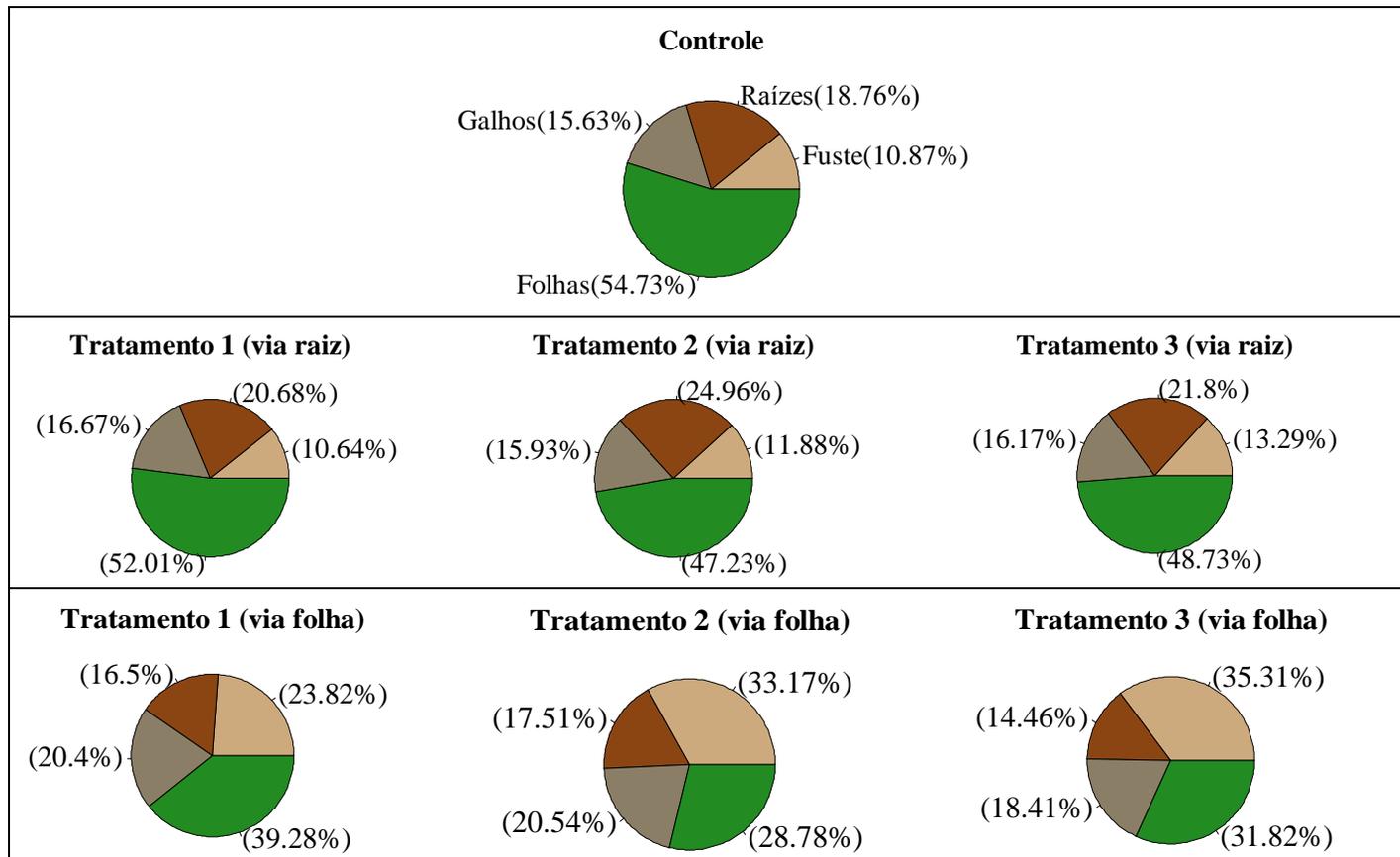
¹ Valores referentes a desvio padrão(g) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 3 não houve grandes alterações na partição de fotoassimilados nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular quando comparado ao tratamento controle. Por outro lado, nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar a partição de fotoassimilados alterou-se substancialmente.

No tratamento controle aproximadamente 55% dos fotoassimilados foram destinados às folhas, 26% para os compartimentos lenhosos (Fuste + galho) e 19% para as raízes. Enquanto que para os tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular foi, em média, de aproximadamente 49% para as folhas, 28% para os compartimentos lenhosos (Fuste + galho) e 23% para as raízes. Já para os tratamentos via pulverização foliar a partição foi, em média, de aproximadamente 33% para as folhas, 51% para os compartimentos lenhosos (Fuste + galho) e 16% para as raízes.

Nota-se ainda que, nos tratamentos 1 e 2 (aplicação hormonal via pulverização foliar), houve um aumento progressivo da destinação de fotoassimilados para os compartimentos lenhosos (fuste + galhos) (FIGURA 3). Enquanto que no tratamento 1 a partição para compartimentos lenhosos representava aproximadamente 44%, nos tratamentos 2 e 3 a partição para os mesmos compartimentos foi de aproximadamente 54%.

Figura 3– Partição de massa seca por compartimento da planta por tratamento.



A aplicação hormonal por duas vias (raiz e folha) teve como intuito verificar as possíveis diferenças na utilização dos hormônios pelos compartimentos da planta. Sabe-se que IAA pode, dentre outras vias, se mover pela via não polar, o qual move-se rapidamente para cima e para baixo no floema e pode também, de uma forma mais lenta, se mover pela via polar através do câmbio vascular (ALONI, 2004). Desta forma, no que se refere à translocação de IAA, acredita-se não haver diferença na absorção de IAA entre as duas formas de aplicação do mesmo.

O transporte de GA é bem menos compreendido. Pensava-se que a giberelina era transportada, a partir de seu local de biossíntese até o câmbio vascular, pelo floema e xilema (DAVIES, 1995), no entanto, novas evidências sugerem que a biossíntese de giberelina e a sua ação ocorrem no mesmo tecido, e possivelmente até mesmo nas mesmas células (SPONSEL; HEDDEN, 2004). No entanto, diversos estudos mostram que aplicação exógena de GA (via pulverização) provoca aumento do crescimento e desenvolvimento da planta (CASPER; TAYLOR, 1989; CASTRO, 1981; FU; HARBERT, 2003; MODESTO; RODRIGUES; PINHO, 1996; SID AHMED, 1978; YAXLEY et al., 2001), desta forma, mesmo se a biossíntese e uso da GA ocorrer no mesmo tecido, a hipótese de transporte da GA, pelo menos quando aplicado nas folhas, não deverá ser descartada. Diante do exposto, no que se refere à translocação de GA, acredita-se haver diferença entre as duas formas de aplicação.

Pelos resultados apresentados na Tabela 4 parece que de fato não ocorre transporte de GA quando aplicado via sistema radicular, uma vez que as diferenças observadas para o acúmulo de massa seca (tratamentos com aplicação hormonal via raiz) nos compartimentos fuste, galhos e folhas não foram suficientemente grandes a ponto de se diferirem do tratamento controle. Quanto ao transporte de IAA, considerando a consistência e extensivo número de estudos relativos ao seu transporte, acreditamos que o mesmo tenha se

translocado por alguma via, possivelmente a via não polar (ALONI, 2004), e que a ausência de significância estatística no acúmulo de massa seca da parte aérea (Fuste + folhas + galhos) (TABELA 4) se deu pela falta de sinergismo com a GA, conforme relatado por (ROSS et al., 2000; WOLBANG et al., 2004; WOLBANG; ROSS, 2001). Uma evidência que o IAA foi transportado para a parte aérea é o indício de intoxicação observada no tratamento 3. No entanto, os hormônios agiram significativamente no compartimento de contato imediato: a raiz. Nota-se que no tratamento 2 (via raiz) acúmulo de massa seca nas raízes foi significativamente maior quando comparado aos demais tratamentos de ambas as formas de aplicação hormonal (TABELA 4), sendo que essas apresentaram aproximadamente 35% mais massa seca de raiz que as plantas do tratamento controle.

A aplicação hormonal via folha apresentou um claro aumento da destinação de massa seca (fotoassimilados) para os compartimentos lenhosos (fuste + galhos). Da mesma forma, houve um aumento progressivo da destinação de fotoassimilados para os compartimentos lenhosos (fuste + galhos) com o aumento da dosagem hormonal (FIGURA 3). Esses resultados sugerem que essas diferenças na alocação de biomassa devem ser uma consequência direta da aplicação hormonal, em vez de efeitos indiretos da taxa de crescimento alterada (controle x tratamentos via folha), uma vez que o aumento da dosagem hormonal levou ao aumento da deposição de massa seca para fuste e galhos.

A explicação para este comportamento pode, pelo menos parcialmente, estar no fato de GA e IAA promoverem mais fortemente o crescimento de caules nas plantas, conforme observado por Booth et al. (1962), Castro e Fachinello (1993), Gersani, Lips e Sachs (1980), Mullins (1970), Nagel, Konings e Lambert (2001) e Tanimoto (1987), o que levaria ao aumento da intensidade de dreno do caule e como consequência o aumento da taxa de translocação de fotoassimilados em direção ao caule. Portanto, a maior partição de

fotoassimilados para o crescimento do caule nos tratamentos com pulverização foliar é possivelmente, uma consequência do aumento do gradiente de pressão no caule o que acarreta na redução no fornecimento de fotoassimilados para folhas e raízes (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Estudos com mutantes de tomate com baixa produção de GA suportam essa ideia, uma vez que quando os mesmos são submetidos a uma mesma taxa de crescimento apresentam menor partição de carbono para o crescimento do broto e maior partição para as suas raízes quando comparados ao tipo selvagem (NAGEL; LAMBERS, 2002). Nagel, Konings e Lambers (2001) também estudando mutantes com baixa produção de GA encontram menor acumulação de amido, açúcares solúveis e o material de parede celular causando uma menor percentagem de matéria seca nos caules.

Além de a auxina regular a intensidade do dreno pela estimulação da taxa de crescimento do tecido dreno (mediação da divisão e alargamento celular, conforme demonstrado por Ross et al. (2000), Uggla, Mellerowicz e Sundberg (1998), Wolbang et al. (2004) e Wolbang e Ross (2001), há evidências de efeitos diretos da IAA sobre o transporte (PATRICK, 1979) e controle da importação de fotossintatos para o dreno (HANSEN; GROSSMANN, 2000).

O tratamento com maior dosagem hormonal de ambas as vias de aplicação (Tratamento 3) sofreu com fitointoxicação. Os efeitos negativos na fisiologia da planta devido à alta dose hormonal do tratamento 3, principalmente na aplicação via foliar, se reverteram no decréscimo do acúmulo de massa seca nos tratamentos em questão (TABELA 4). É provável que a fitotoxidez tenha ocorrido pela elevada dosagem de IAA nesses tratamentos. A auxina, quando em altas concentrações, tem efeito inibitório e é dependente da espécie (DAVIES, 2004; TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007). A inibição observada quando as concentrações de auxina excedem os níveis ótimos é, em geral, atribuída à biossíntese de etileno induzida por auxina (AYALA-SILVA et

al., 2005; ROMANO; COOPER; KLEE, 1993). O etileno, por sua vez, é capaz de inibir o alongamento de caule e raízes em muitas espécies (DAVIES, 2004), o que reflete no menor acúmulo de massa seca.

3.2 Variação anatômica ao longo do caule das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais

Nessa seção serão apresentados os resultados e discussões referentes as características anatômicas tomadas em três posições ao longo do caule (10, 30 e 50% da altura total).

3.2.1 Variação morfológica das fibras ao longo do caule

A forma de aplicação do hormônio, se via pulverização foliar ou se via sistema radicular, alterou o comportamento ao longo do caule do comprimento e largura das fibras, conforme pode ser observado nos gráficos da Figura 4. O comprimento das fibras nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular apresentou tendência de maiores comprimentos de fibra a 30% da altura da planta. Enquanto que os tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar apresentaram tendência de maiores comprimentos de fibras a 10% da altura da planta. No tratamento controle observa-se uma sutil redução do comprimento das fibras a 50% da altura da planta.

A largura das fibras nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular apresentou tendência de maiores larguras de fibra a 30% da altura da planta (FIGURA 4). Nos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar nota-se tendência de maiores larguras de fibras nas posições mais baixas no fuste (30 e 50% da altura da planta). Quanto ao tratamento controle maiores larguras de fibras tenderam a ser observadas a 10% da altura da planta (FIGURA 4).

Figura 4 – Variação longitudinal da expansão das fibras por tratamento.

(Continua)

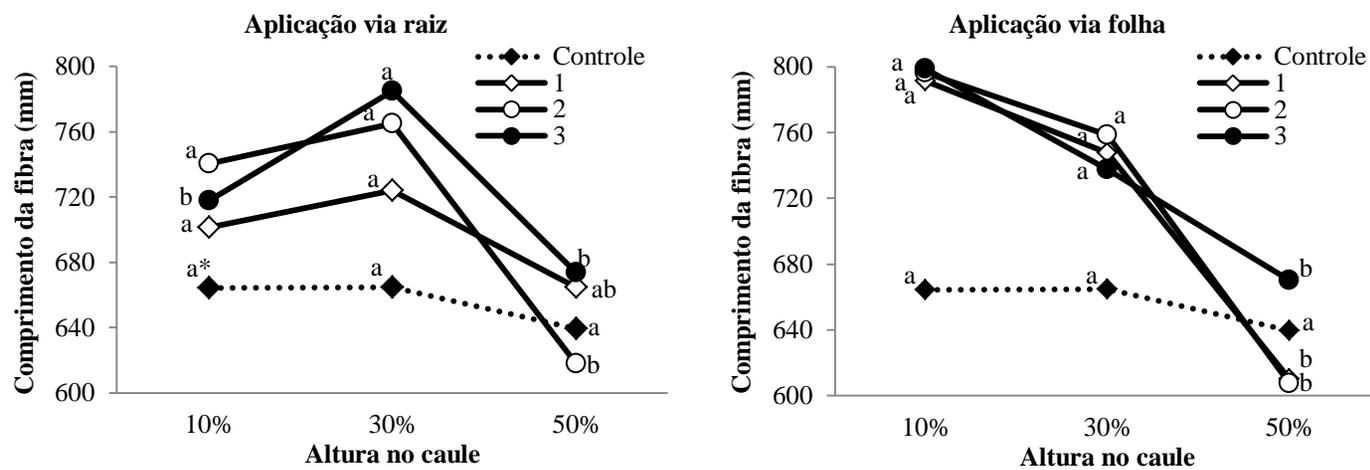
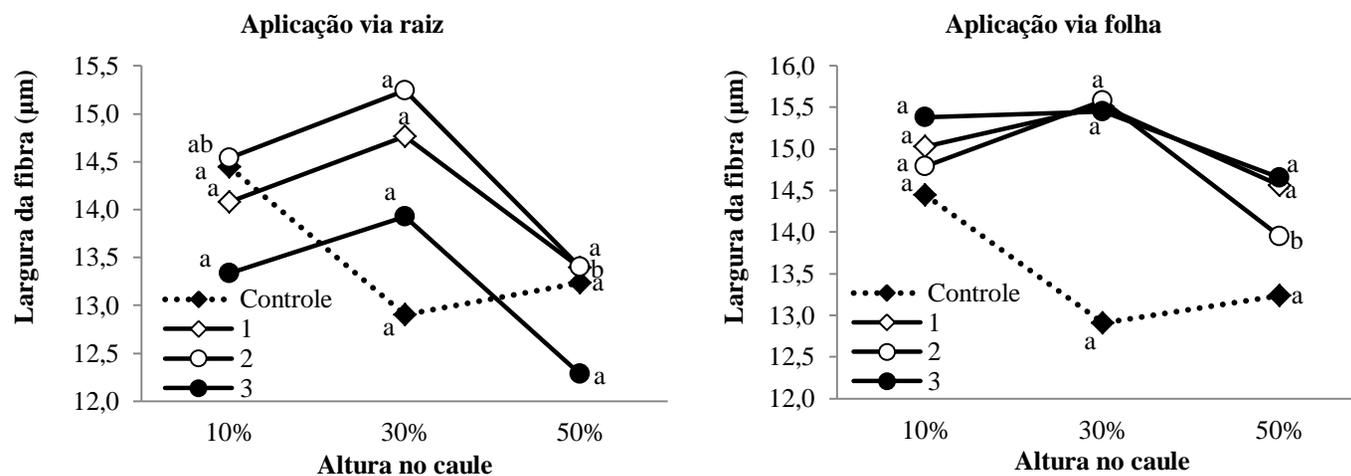


Figura 4 – Variação longitudinal da expansão das fibras por tratamento.

∞

(Conclusão)



*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A variação ao longo do caule para o comprimento e largura da fibra, das plantas tratadas com hormônio via pulverização foliar (FIGURA 4) pode, pelo menos em parte, ser causada pelo gradiente longitudinal decrescente de concentração de IAA a partir do topo (local de biossíntese e aplicação exógena de IAA) em direção às raízes, conforme também verificado por Aloni (2001) e Ugglá, Mellerowicz e Sundberg (1998). Baixa concentração de IAA promove o alongamento e alargamento nas dimensões das fibras como observados nas alturas 10 e 30% do caule (FIGURA 4) por permitirem diferenciação celular lenta. Por outro lado, elevada concentração de IAA promove a rápida diferenciação celular, permitindo apenas um tempo limitado para o alongamento e alargamento celular resultando assim em fibras curtas e estreitas, como as observadas a 50% da altura total (FIGURA 4). Essa hipótese para explicar a variação nas dimensões das fibras é ainda apoiada por várias observações: (1) IAA é transportado a partir das folhas para as raízes (ALONI, 2001); (2) a principal via do fluxo de IAA em caule está no câmbio vascular (SUNDBERG; UGGLA; TUOMINEN, 2000); (3) diversos estudos com árvores relatam a variação longitudinal dos elementos anatômicos mostrando sua gradual diminuição no sentido base-topo (MUNERI; RAYMOND, 2001; ROCHA; FLORSEM; COUTO, 2004; VALENTE et al., 2013).

A hipótese de que o gradiente de concentração de IAA é o responsável pelas variações nas dimensões das fibras é ainda apoiada pelos resultados obtidos neste trabalho com aplicação hormonal via sistema radicular. Observa-se que as fibras desses tratamentos tenderam a ser mais longas e largas a 30% da altura total da planta, altura na qual possivelmente há menores concentrações de IAA (FIGURA 4). Acreditamos que as menores concentrações de IAA se encontram a 30% da altura total da planta devido a um provável gradiente “artificial” decrescente de IAA a partir das raízes para o topo da planta formado pelo transporte do IAA exógeno aplicado via sistema radicular. Esta hipótese

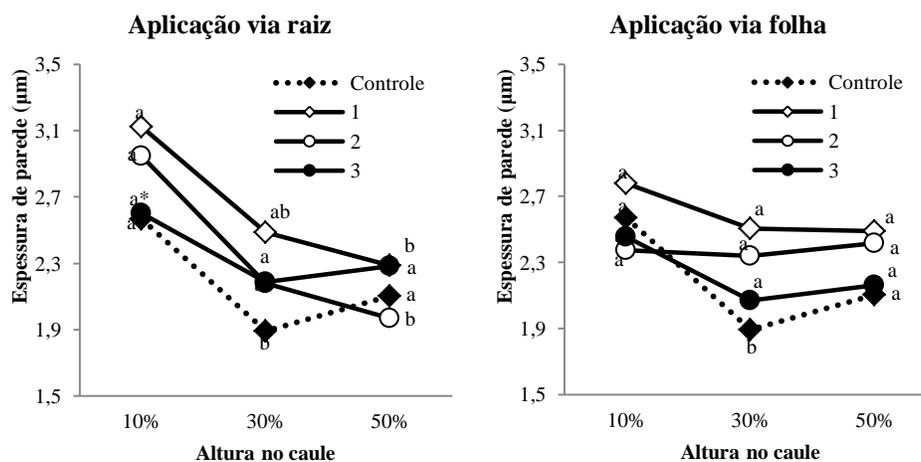
pode ser futuramente testada por meio de análise de concentração hormonal em diferentes alturas no fuste de plantas que receberam hormônio via sistema radicular. Desta forma, os caules das plantas desses tratamentos possuem dois gradientes decrescentes de concentração de IAA, sendo seus pontos de máximo opostos, ou seja, raízes e topo da planta. Esses dois gradientes foram os responsáveis pelo comportamento observado para a variação do comprimento e largura das fibras nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular (FIGURA 4).

Independente da forma da aplicação hormonal (se via sistema radicular ou se via pulverização foliar) nas alturas de 10 e 30% as plantas tratadas com hormônio tiveram fibras mais longas que as das plantas do tratamento controle (FIGURA 4). Este comportamento é facilmente compreendido, uma vez que, IAA e GA promovem o crescimento celular (ALONI, 1979; BJÖRKLUND, 2007; MCKENZIE; DEYHOLOS, 2011; ROBERTS; GAHAN; ALONI, 1988; SAVIDGE, 2000). No entanto, tal comportamento não foi observado a 50% da altura total. Uma possível explicação seria a idade das iniciais cambiais, conforme proposto por Yang, Davies e Reid (1986) que supõe que as características dos elementos anatômicos da madeira estejam relacionadas com o ano de formação das iniciais cambiais.

Conforme apresentado na Figura 5, a espessura de parede das fibras foi menos variável nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar que nas plantas dos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular e nas plantas do tratamento controle. Para as plantas dos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar não houve significância estatística para a espessura de parede entre as alturas amostradas. Por outro lado, para as plantas do tratamento controle menores espessuras foram observadas a 30% da altura total da planta. Comportamento similar é observado nas plantas do tratamento 3 de ambas as formas de aplicação hormonal, no entanto, não apresentou

significância estatística. Nas plantas dos tratamentos 1 e 2 que receberam hormônio via sistema radicular houve tendência estatisticamente significativa de redução da espessura de parede no sentido base-topo (FIGURA 5).

Figura 5 – Variação longitudinal da espessura da parede das fibras por tratamento.



*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O comportamento da variação da espessura de parede das fibras ao longo do caule pode ser explicado pela relação entre a concentração de IAA e GA nas diferentes alturas no fuste (FIGURA 5). Segundo Aloni (1979) e Roberts, Gahan e Aloni (1988), a alta relação IAA/GA, como é o caso das plantas com aplicação hormonal via raiz (considerando o não transporte de GA), estimula a formação de fibras com paredes secundárias espessas, enquanto que a baixa relação IAA/GA, como é o caso das plantas que receberam hormônio via pulverização foliar, estimula fibras com paredes secundárias delgadas.

Foi demonstrado que em árvores existe um gradiente longitudinal natural decrescente de concentração de IAA a partir da copa (local de biossíntese de IAA) para a base do fuste (ALONI, 2001; UGGLA; MELLEROWICZ;

SUNDBERG, 1998). Relativo ao GA, não foram encontrados estudos relativos a gradientes longitudinais. No entanto, como um dos locais de produção de GA é o meristema apical (TAIZ; ZEIGER, 2006), é muito provável que seu gradiente de distribuição seja similar ao da IAA. Assim, partindo do pressuposto que apenas IAA foi transportada a partir das raízes para o topo da planta nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular (conforme discutido anteriormente para comprimento e largura das fibras e também na seção 3.1.1) e que desta forma, um gradiente “artificial” decrescente de IAA a partir das raízes para o topo da planta foi formado, os resultados obtidos nesse trabalho para os tratamentos 1 e 2 com aplicação hormonal via sistema radicular evidencia a influência hormonal no espessamento da parede celular secundária das fibras. As fibras com maiores espessuras de parede na posição 10% da altura nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular (alta concentração de IAA gerada pelo gradiente “artificial” e baixa concentração de GA gerada pelo gradiente natural) comparadas às menores espessuras de parede das fibras na posição 30% (baixa concentração de IAA e concentração intermediária de GA) e as, ainda menores, espessuras de parede das fibras na posição 50% da altura total da planta (alta concentração de IAA gerada pelo gradiente natural e alta concentração de GA) sugerem que alta relação IAA/GA estimula a formação de fibras com paredes secundárias espessas em *Eucalyptus* (FIGURA 5), conforme também encontrado por Aloni (1979) e Roberts, Gahan e Aloni (1988) para outras espécies de plantas.

O comportamento ao longo do caule da espessura de parede das fibras observado para o tratamento 3, de ambas as formas de aplicação hormonal, se assemelha ao observado no controle (FIGURA 5). Tal resultado é mais um indicativo da toxicidade da dosagem hormonal utilizada nos tratamentos 3. A intoxicação foi possivelmente causada pela interação entre IAA e a via

biossintética do etileno (AYALA-SILVA et al., 2005; ROMANO; COOPER; KLEE, 1993).

Considerando que tanto IAA como GA foram transportadas nos tratamentos em que a aplicação hormonal ocorreu via pulverização foliar (conforme discutido na seção 3.1), acreditamos que as concentrações de ambos os hormônios foram elevadas a tal ponto que estimulou a menor variabilidade do espessamento da parede celular ao longo do fuste das plantas dos tratamentos 1 e 2 com aplicação hormonal via pulverização foliar (FIGURA 5). Isso porque ao analisarmos o comportamento da variação longitudinal da espessura da parede entre os tratamentos 1 e 2 notamos que, apesar de não significativa, a espessura da parede a 10% foi maior que a 30 e 50% da altura da planta no tratamento 1, enquanto que no tratamento 2 a variação entre as posições no fuste foi mínima (TABELA 5). Essa observação, juntamente com o comportamento apresentado pelo tratamento 3, sugere a existência de um limiar ótimo da concentração hormonal para a variabilidade do espessamento da parede celular secundária das fibras.

Os menores valores de espessura de parede observada para a posição 10% da altura total nas plantas tratadas via pulverização foliar quando comparadas com a mesma posição nas plantas com aplicação hormonal via sistema radicular (FIGURA 5) é, possivelmente, devido à baixa relação IAA/GA nas plantas com aplicação hormonal via pulverização foliar, conforme relatado por Aloni (1979) e Roberts, Gahan e Aloni (1988), uma vez que a relação IAA/GA adotada nesse estudo foi de 1/10.

Quando comparamos o perfil de variação das características das fibras ao longo do caule entre formas de aplicação hormonal notamos que a variação relativa à espessura de parede e à largura das fibras foi menor nos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar (FIGURA 4 e FIGURA 5). Tal resultado é interessante para o uso da madeira em processos industriais, uma vez

que, quanto mais homogênea é a matéria-prima mais fácil é o controle da qualidade do produto. Para o comprimento de fibras apenas houve alteração na configuração da variação (FIGURA 4), mas de uma forma global a heterogeneidade foi similar em ambas as formas de aplicação (coeficiente de variação de 13.3 e 12.5% para os tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar e via sistema radicular, respectivamente).

3.2.2 Variação morfológica dos elementos de vasos ao longo do caule

Na Figura 6 podemos observar que as plantas dos tratamentos 1 e 2 que receberam hormônio via sistema radicular tenderam a apresentar menores diâmetros e maiores frequências de vasos a 50% da altura da planta. No entanto, não apresentaram significância estatística. O tratamento 3 teve um comportamento similar, porém a posição 10% da altura total diferiu-se estatisticamente apresentando maiores diâmetros de vasos que as demais posições no caule.

De uma forma geral, os tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar tenderam a apresentar menores diâmetros e maiores frequências de vasos com o aumento na altura da planta (10% - 50%). Tal comportamento apenas não foi significativo estatisticamente para o tratamento 3. Enquanto que para as plantas do controle, diâmetro e frequência de vasos foram aproximadamente constantes ao longo do caule (FIGURA 6).

Figura 6 - Variação longitudinal do diâmetro e frequência de vasos por tratamento.

(Continua)

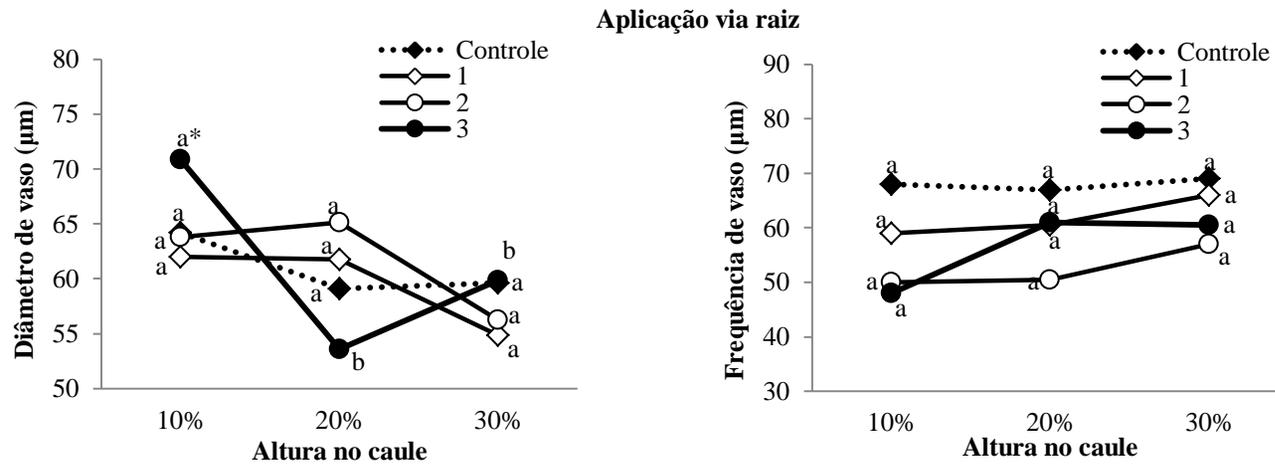
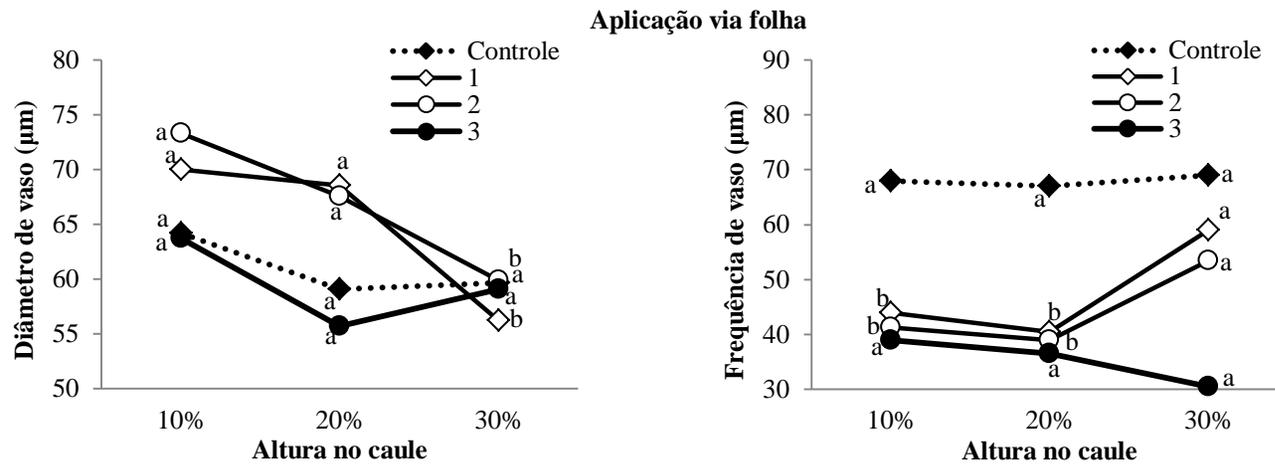


Figura 6 - Variação longitudinal do diâmetro e frequência de vasos por tratamento.

(Conclusão)



*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Os vasos são fundamentais para o desenvolvimento das plantas, uma vez que, em folhosas, como o *Eucalyptus*, eles representam a principal via de transporte de água. Um eficiente sistema hidráulico para suportar a transpiração das plantas durante a fotossíntese promoverá uma elevada taxa metabólica nas árvores e, conseqüentemente influenciará no seu crescimento (SORCE et al., 2013).

Segundo Aloni (2001), Aloni e Zimmerman (1983) e Leitch (2001) a frequência e diâmetro de vasos são controlados pela concentração de auxina: altas concentrações (próximo dos locais de síntese de auxina- folhas) induzem a maiores frequências e menores diâmetros, enquanto que as baixas concentrações (mais abaixo no caule - base) induzem a menores frequências e maiores diâmetros. De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo (FIGURA 6) são consistentes com as observações de Aloni (2001), Aloni e Zimmerman (1983) e Leitch (2001). A análise de correlação entre o diâmetro e a frequência de vasos para os tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular e via pulverização foliar (excluindo o tratamento 3) foi de -0.86, e no tratamento controle foi de -0.68. A baixa correlação entre diâmetro e frequência de vaso observada para o tratamento 3 (-0.28) com aplicação hormonal via pulverização foliar possivelmente deve-se ao desbalanço hormonal provocado, principalmente, pelas altas dosagens de IAA.

Os tratamentos 1 e 2 que receberam hormônio via sistema radicular apoiam a hipótese que frequência e diâmetro de vasos são controlados pela concentração de auxina. A aplicação de IAA via sistema radicular possivelmente gerou um gradiente decrescente de concentração de IAA a partir das raízes para a copa (conforme discutido anteriormente), o qual juntamente com o gradiente natural de concentração de IAA decrescente a partir da copa para as raízes (UGGLA; MELLEROWICZ; SUNDBERG, 1998), foram capazes de promover a menor variação nos valores de diâmetros e frequência de vasos entre as alturas

da planta (FIGURA 6). O comportamento do tratamento 3 dessa forma de aplicação hormonal pode ter alguma relação com o desbalanço hormonal, conforme discutido anteriormente para o tratamento 3 com a aplicação hormonal via pulverização foliar.

Observando o comportamento da variação longitudinal do diâmetro de vaso nas plantas dos tratamentos 1 e 2 com aplicação hormonal via pulverização foliar é facilmente perceptível que estas plantas possuem maior afilamento de vasos (aumento em diâmetro dos vasos a partir da extremidade apical para a base) que as plantas do tratamento controle (FIGURA 6). Segundo Sorce et al. (2013) o afilamento de conduta é, provavelmente, um dos mais importantes e universal mecanismos de controle das árvores para o aumento da resistência hidráulica com o aumento de sua altura. Desta forma, as plantas dos tratamentos 1 e 2 com aplicação hormonal via pulverização foliar possuem maior eficiência de transporte de água devido ao maior afilamento dos vasos, conforme verificado por Becker, Gribben e Lim (2000) e Petit, Anfodillo e Zan (2011).

Sorce et al. (2013) sugeriram que, possivelmente, as plantas adotem um mecanismo para modular a duração da etapa de alargamento celular para conceber precisamente uma arquitetura de condutas afuniladas otimizadas para fins hidráulicos. Os mesmos autores citaram como evidência um estudo recente de Anfodillo et al. (2011) os quais mostraram que as células mais amplas ao longo do tronco são aquelas que passam mais tempo pela fase de expansão (crescimento) durante a xilogênese. Unindo os resultados desses trabalhos com as evidências deste estudo é possível deduzir que o mecanismo de controle do diâmetro de vasos se dê pelos gradientes radiais e longitudinais de concentração de IAA. Isso porque, o aumento da altura da planta, possivelmente, aumenta as diferenças de concentração de IAA a partir da copa em direção às raízes garantindo assim um afilamento de conduta necessário para um eficiente transporte de água. Essa ideia é apoiada pelos resultados obtidos nas plantas do

tratamento controle que apresentam pouco afilamento e baixa estatura (FIGURA 6 e FIGURA 1).

3.2.3 Variação morfológica dos raios ao longo do caule

Conforme apresentado na Figura 7 as plantas que receberam hormônio via pulverização foliar e as plantas do tratamento controle apresentaram, de uma forma geral, aumento da altura de raios no sentido da base para o topo do caule. De forma similar, porém não significativa, os tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular também tenderam a apresentar maiores alturas de raios a 50% da altura da planta.

Relativo à largura de raios, apenas as plantas do tratamento controle se diferiram estatisticamente, com a posição de amostragem a 10% da altura da planta apresentando menores larguras de raios. Enquanto que, para frequência de raios nenhum tratamento apresentou significância estatística entre as posições amostradas ao longo do caule da planta (FIGURA 7).

Figura 7 - Variação longitudinal das dimensões e frequência dos raios por tratamento.

(Continua)

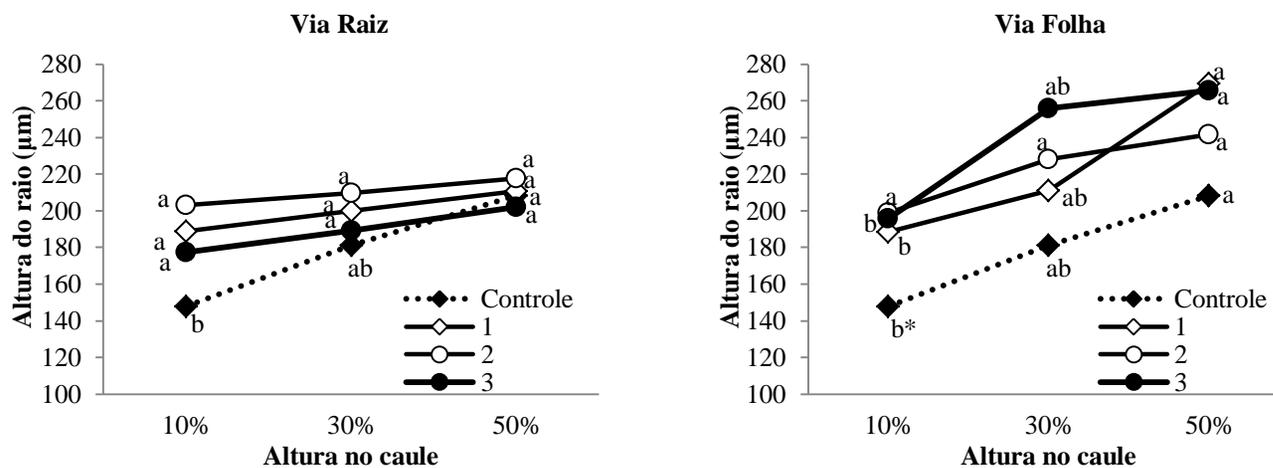


Figura 7 - Variação longitudinal das dimensões e frequência dos raios por tratamento.

(Continuação)

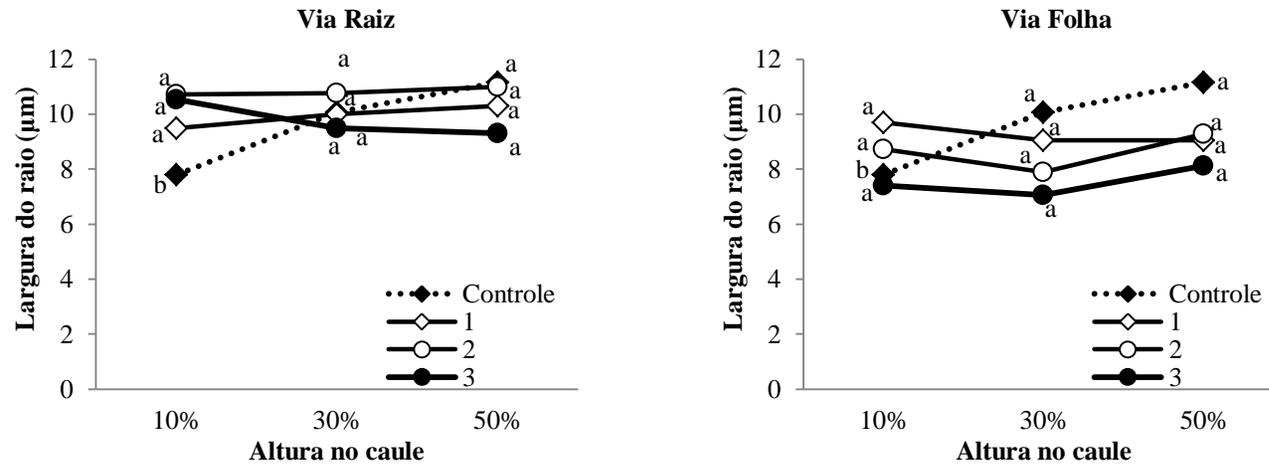
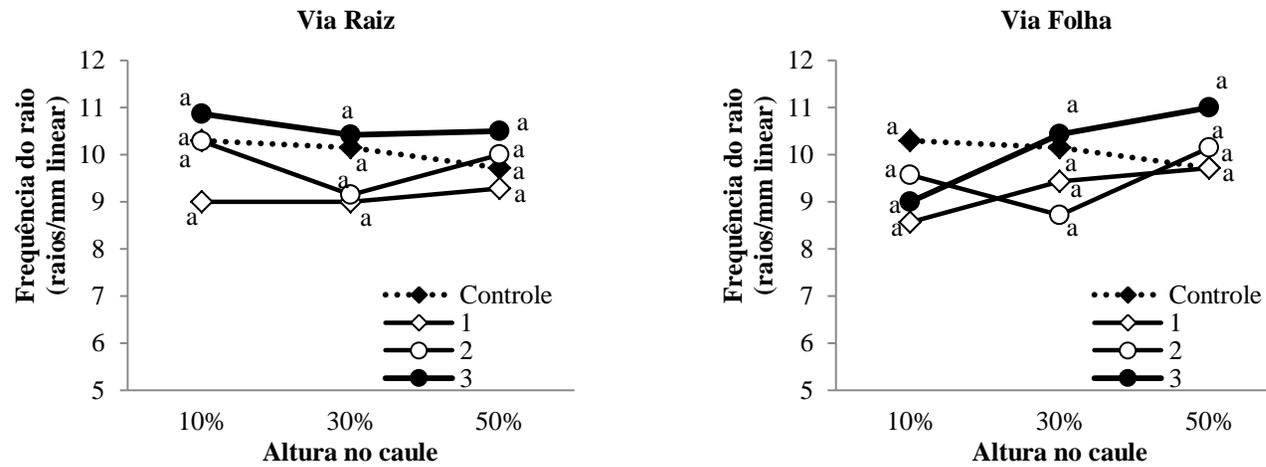


Figura 7 - Variação longitudinal das dimensões e frequência dos raios por tratamento.

(Conclusão)



*Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A “*Ethylene Aeration Hypothesis*” formulada por Lev-Yadun e Aloni (1995) hipotetiza que a indução (frequência) de raios é, principalmente, controlada pelo fluxo radial de etileno, enquanto que as dimensões dos raios também são controladas pelo gradiente longitudinal de auxina. Segundo tal hipótese, a diminuição gradual do gradiente de auxina a partir de folhas para as raízes resulta em um aumento relativo na influência de um sinal de fluxo radial, resultando na tendência geral de aumento do tamanho do raio com o crescimento em circunferência do fuste.

Os resultados encontrados neste estudo (FIGURA 7) não apresentam evidências de que a “*Ethylene Aeration Hypothesis*” é aplicável a *Eucalyptus* no estágio ontogênico utilizado neste trabalho. Esta ideia é apoiada pelos resultados obtidos para as plantas controle, a qual apresenta comportamento de variação de raios similar aos das plantas que receberam aplicação de hormônios (FIGURA 7).

3.3 Variação anatômica média da madeira em experimento dose-resposta a hormônios vegetais

Nessa seção serão apresentados os resultados e discussões referentes as características anatômicas médias, obtidas a partir de três posições ao longo do caule (10, 30 e 50% da altura total).

3.3.1 Fibras

Conforme apresentado na Tabela 5 o comprimento médio das fibras entre os tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar e os tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular não apresentam diferença estatística entre si. No entanto, ambas as formas de aplicação hormonal se diferiram do controle apresentado, em média, fibras 12% mais longas.

Relativo à largura de fibras, de uma forma geral, menores larguras de fibras foram observadas nas plantas do tratamento controle, seguido das plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular e por fim das plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar (TABELA 5).

Apenas o tratamento 1, em ambas as formas de aplicação hormonal, diferiu do tratamento controle apresentando maiores espessuras de paredes das fibras (TABELA 5).

Tabela 5 – Características média das fibras por tratamento.

Tratamento	Características das fibras (μm)				
	Comprimento	Largura	Espessura de parede		
Controle	658,90 b* (69,81 / 10,63) ¹	13,59 c (1,25 / 9,29)	2,21 b (0,52 / 24,28)		
Aplicação	via raiz	1	704,60 a (74,58 / 10,57)	14,23 b (1,50 / 10,48)	2,80 a (0,55 / 21,11)
		2	732,96 a (100,46 / 14,16)	14,61 b (1,48 / 10,31)	2,50 ab (0,64 / 27,95)
		3	738,76 a (92,27 / 12,71)	13,91 bc (1,73 / 12,96)	2,38 ab (0,72 / 30,94)
	via folha	1	742,16 a (99,93 / 13,88)	15,30 a (1,38 / 9,02)	2,61 a (0,55 / 21,35)
		2	749,26 a (110,46 / 15,33)	14,99 ab (1,63 / 11,01)	2,37 ab (0,30 / 12,45)
		3	746,85 a (79,90 / 10,77)	15,30 ab (1,37 / 8,97)	2,31 ab (0,49 / 22,61)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão (μm) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

Partindo do pressuposto que ambos os hormônios tenham sido transportados para o caule das plantas nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar, e que apenas IAA tenha sido transportada para o caule nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular, conforme discutido nas seções 3.1 e 3.2, este estudo sugere que IAA estimula o alongamento celular, uma vez que não houve diferença estatística no comprimento da fibra entre a forma de aplicação hormonal (via raiz ou via folha) e ainda que GA estimula o alargamento e divisão celular, uma vez que plantas que receberam hormônio via pulverização foliar tenderam a possuir fibras mais largas (TABELA 5) e tiveram maior número de células por série radial do xilema secundário (TABELA 1) que as plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular. A ideia que GA estimula a divisão celular é ainda apoiada pela baixa estatura das plantas com aplicação hormonal via sistema radicular. Essas plantas foram em média aproximadamente 45% mais baixas que aquelas dos tratamentos via pulverização foliar (FIGURA 1). Essa grande diferença na estatura das plantas não pode ser explicada apenas pelos menores comprimentos das fibras das plantas que receberam hormônio via sistema radicular, uma vez que foram, em média, aproximadamente apenas 3% menores que aquelas que receberam hormônio via pulverização foliar (TABELA 5). Desta forma, acredita-se que as menores concentrações de GA no caule das plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular tenham afetado a divisão celular do meristema apical o que, conseqüentemente, determinou as menores estaturas das plantas nesses tratamentos. Essa hipótese é apoiada por Cho e Kende (1997) que estudando arroz de águas profundas, que sofre rápido alongamento do caule, após submersão, mostrou que o alongamento do caule ocorreu através de um aumento na divisão celular do meristema intercalar, divisão celular a qual foi induzida por GA na transição de G_1 para a fase S (LORBIECKE; SAUTER, 1998). A transição da fase G_1 para a S é um

ponto crucial no processo de divisão celular (mitose), uma vez que, se a célula o atinge é impossível retornar (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, não se sabe ao certo a forma de transporte de GA.

Foi proposto que o papel principal de GA na diferenciação do xilema secundário de *Aspen* sp. foi o de estimular o alongamento das células (ISRAELSSON; SUNDBERG; MORITZ, 2005). No entanto, a aplicação exógena de GA não aumentou o comprimento das fibras do xilema secundário de *Linum* (MCKENZIE; DEYHOLOS, 2011) e nem de *Eucalyptus* neste estudo. Esses resultados sugerem que a concentração de GA não é um fator limitante durante o alongamento da fibra em *Eucalyptus*. Os resultados deste trabalho apoiam a hipótese de que GA atua como um fator permissivo, ao invés de fator regulatório no alongamento das células do caule, conforme hipotetizado por Cleland (2010), isto significaria que GA deve estar presente para então a IAA promover o alongamento das células. Essa hipótese justifica os resultados obtidos neste trabalho para o comprimento das fibras, uma vez que GA, apesar de em menores concentrações, também estava presente nas plantas tratadas com hormônio via sistema radicular (GA natural).

Em relação ao espessamento secundário da parede celular das fibras, a aplicação hormonal, independente da forma de aplicação, aumentou em média 13% a deposição da parede secundária (TABELA 5). Aloni (1979) e Roberts, Gahan e Aloni (1988) afirmam que alta relação IAA/GA produz fibras curtas e espessas, enquanto que baixas relações IAA/GA resultam em fibras longas e delgadas, esses cenários se enquadram na forma de aplicação hormonal via sistema radicular e via pulverização foliar desta tese, respectivamente. Apesar de não diferirem estatisticamente, as fibras dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular foram aproximadamente 3% mais curtas e 5% mais espessas que as fibras das plantas com aplicação hormonal via pulverização

foliar (TABELA 5), corroborando com os resultados obtidos por Aloni (1979) e Roberts, Gahan e Aloni (1988).

A falta de um expressivo efeito estimulador ou inibidor com o aumento da dosagem hormonal sobre o desenvolvimento das fibras foi um pouco surpreendente à luz dos resultados reportados em outras espécies (EL-SHOUBAGY; ABDEL-GHAFFAR; EL-NAGGAR, 1995; SAMANTARAI; NANDA, 1979; SAVIDGE, 2000; SNOW, 1935). As diferenças entre nossos resultados e os de outros autores podem ser devido às condições de tratamento. Nos estudos anteriores, os caules foram “decapitados” (meristema apical foi removido) e desfolhados de modo que a biossíntese de hormônio endógeno fosse criticamente prejudicada. Em plantas intactas os níveis hormonais estão próximos do ótimo, fazendo com que as aplicações exógenas apresentem efeitos, relativamente, reduzidos.

3.3.2 Elementos de vasos

Conforme apresentado na Tabela 6 maiores diâmetros de vasos tenderam a ser observados no tratamento 2, independente das formas de aplicação hormonal. Relativo à frequência de vasos, apenas o tratamento 3 com aplicação hormonal via pulverização foliar se diferiu do tratamento controle apresentando menor frequência de vasos.

De uma maneira geral, maiores diâmetros e menores frequências de vasos foram observados para os tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar (TABELA 6). Em média, as plantas desses tratamentos tiveram vasos 4% mais largos e 26% menos frequentes que as plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular.

Tabela 6 – Características média dos elementos de vasos por tratamento.

Tratamento		Características dos elementos de vasos	
		Diâmetro (μm)	Frequência (vasos/ mm^2)
Controle		61,09 ab* (9,86 / 16,13) ¹	54,50 ab (10,41 / 19,09)
Aplicação via raiz	1	58,32 b (14,27 / 24,26)	63,25 a (13,18 / 20,83)
	2	64,45 ab (11,69 / 18,13)	50,25 ab (10,81 / 21,52)
	3	59,79 b (12,52 / 20,94)	56,5 ab (12,42 / 21,99)
Aplicação via folha	1	63,47 ab (10,57 / 16,65)	47,83 b (12,32 / 25,75)
	2	66,79 a (12,51 / 18,72)	42,58 b (8,32 / 19,53)
	3	59,51 b (10,98 / 18,46)	35,33 c (5,85 / 16,57)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão(μm ; vasos/ mm^2) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

A correlação negativa entre diâmetro de frequência de vasos encontrada neste estudo também foi relatada por Aloni (2001), Aloni e Zimmerman (1983) e Leitch (2001). Desconsiderando o tratamento 3 de ambas as formas de aplicação hormonal, pelo motivo de terem, possivelmente, sofrido com desbalanço hormonal, a correlação entre diâmetro e frequência de vaso foi de -0,97.

Em média, os diâmetros de vasos dos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar foram apenas 4% maiores que os diâmetros de vasos das plantas dos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular (TABELA 6). Esses resultados sugerem que o alargamento de vasos parece não

depende da sinalização por GA, considerando que GA não tenha sido transportada nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular (conforme discutido anteriormente nas seções 3.1 e 3.2), o que é diferente do índice de influência positiva da GA no alargamento de fibras (TABELA 5). Uma possível explicação para GA influenciar no alargamento de fibras e não em vasos pode estar na ação de enzimas de afrouxamento da parede celular, uma vez que sua ação difere entre os tipos de células do xilema (WU; COSGROVE, 2000). Sabe-se ainda que vasos possuem maior capacidade de gerar turgescência de crescimento do que as fibras, devido à expressão aquaporina (DEBOER; VOLKOV, 2003; LUU; MAUREL, 2005; VERA-ESTRELLA et al., 2004) e/ou por diferenças na atividade de vacúolos nos vasos em desenvolvimento em relação às fibras (AREND; FROMM, 2003). Assim, como os vasos possuem mais mecanismos que possibilitam seu alargamento comparativamente às fibras, GA pode não influenciar significativamente no processo ou não ser necessário.

De uma forma geral, a frequência de vasos foi mais influenciada pelo abastecimento hormonal que os diâmetros dos mesmos (TABELA 6). Esse resultado tem relação com a determinação do destino celular. As maiores frequências de vasos nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular devem-se possivelmente às maiores concentrações de IAA em relação à GA nessas plantas (considerando o não transporte de GA nessas plantas, conforme discutido anteriormente nas seções 3.1 e 3.2), uma vez que a definição/diferenciação de vasos é particularmente sensível ao abastecimento de auxina (DOLEY; LEYTON, 1968; JUNGHANS et al., 2004). Enquanto que as menores frequências de vasos nas plantas dos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar tem relação com o abastecimento IAA e GA (conforme discutido anteriormente nas seções 3.1 e 3.2), uma vez que a definição/diferenciação de fibras ocorre na presença, em particular, de auxina

em conjunto com ácido giberélico (ALONI, 1987; DIGBY; WAREING, 1966; LEV-YADUN, 2000; RIDOUTT; PHARIS; SANDS, 1996; SAVIDGE, 2000).

Além da importância fisiológica dos vasos no desenvolvimento das plantas, eles também desempenham papel importante nos processos de conversão da madeira em celulose. Sua presença favorece o processo de impregnação dos cavacos pelo licor de cozimento, uma vez que, a comunicação dos vasos com as células adjacentes, através das pontuações, permite que o licor de cozimento migre para o interior dos cavacos. Por outro lado, em papéis de imprimir e escrever os vasos podem provocar o fenômeno chamado de “vessel picking”, o qual consiste no arrancamento dos vasos da superfície do papel na impressão. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a aplicação hormonal possivelmente não afetará a impregnação dos cavacos pelo licor e tão pouco no surgimento de “vessel picking”, uma vez que o diâmetro e frequência de vasos não foram afetados substancialmente como pode ser verificado pela análise estatística que não apresentou significância. De qualquer forma, no Brasil, é adotado alto grau de refinação para fabricação de polpas de eucalipto garantindo que os elementos de vaso fiquem colapsados, o que minimiza o fenômeno de “vessel picking” (FOELKEL, 2007).

3.3.3 Raios

Conforme apresentado na Tabela 7, notamos que os raios tenderam a ser mais altos nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar, seguido das plantas que receberam hormônio via sistema radicular e por fim nas plantas do tratamento controle. Quanto à largura de raios não houve diferença significativa entre as plantas do controle e as plantas dos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular, enquanto que nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar além de se diferirem dos demais apresentou clara tendência de menores larguras de raio com o aumento da

dosagem hormonal. Para frequência de raios não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 7 – Características média dos raios por tratamento.

Tratamento	Características dos raios		
	Altura (μm)	Largura (μm)	Frequência (raios/mm linear)
Controle	174,11 b* (44,40 / 26,82) ¹	9,41 a (2,14 / 22,07)	10,10 a (1,53 / 15,25)
Aplicação via raiz	1	195,43 ab (44,67 / 25,21)	9,77 a (1,17 / 11,35)
	2	207,54 ab (88,11 / 47,08)	10,77 a (0,57 / 5,30)
	3	186,34 b (53,95 / 26,31)	9,90 a (1,12 / 11,47)
Aplicação via folha	1	211,85 a (61,15 / 27,40)	9,29 ab (1,15 / 12,37)
	2	218,28 a (51,42 / 24,50)	8,46 b (1,61 / 18,68)
	3	237,57 a (40,05 / 20,51)	7,38 c (1,12 / 14,92)

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão(μm ; raios/mm linear) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

As variações nos raios são explicadas pela “*Ethylene Aeration Hypothesis*” conforme discutido na seção 3.2.3. Porém, este estudo parece sugerir que essa hipótese é somente aplicável nas plantas em estágio ontogênico mais avançado (conforme discutido na seção 3.2.3). Assim, nossas discussões a respeito das variações nos raios não serão baseadas na hipótese em questão.

Partindo do pressuposto que apenas IAA exógeno foi transportado nos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular e que IAA e GA exógenos tenham sido transportados nos tratamentos que receberam hormônio via pulverização foliar (conforme discutido nas seções 3.1 e 3.2) e observando que não houve diferença estatística entre as plantas controle e as plantas que receberam hormônio via raiz (TABELA 7), podemos sugerir que GA atua positivamente na altura e negativamente na largura dos raios. A não significância estatística para frequência de raios entre os tratamentos sugerem que a iniciação de raios (indução de iniciais de raio no câmbio vascular) não é um processo controlado pelos hormônios IAA e GA. De fato, o início de novos raios começa pelo encurtamento ou subdivisão de iniciais fusiformes (PHILIPSON; WARD; BUTTERFIELD, 1971) que em muitos estudos indicam ser um processo controlado pelo etileno (LEV-YADUN, 1992; LOWERTS; WHEELER; KELLISON, 1986; SMITH, 1967), assim o etileno está envolvido na transformação de iniciais fusiformes para raios iniciais.

3.4 Variação física e química do xilema das plantas em experimento dose-resposta a hormônios vegetais

Não houve variação estatisticamente significativa entre ou dentro dos tratamentos para a densidade básica (TABELA 8). Devido ao baixo volume de material produzido, principalmente pelas plantas dos tratamentos que receberam hormônio via sistema radicular e tratamento controle, não foi possível determinar teor de lignina e teor de extrativos com repetições, ou seja, para obter-se massa suficiente para as análises, os caules de 3 plantas por tratamento foram moídos juntos e as análises realizadas a partir dessas amostras compostas. Devido à impossibilidade de repetições, não foi possível realizar comparação estatística de média.

Tabela 8 – Densidade básica e teor de lignina por tratamento.

Tratamento		Densidade básica (g/cm ³)	Teor de extrativos (%)	Teor de lignina (%)
Controle		0,390 a* (0,034 / 9,34) ¹	5,04	25,60
Aplicação via raiz	1	0,407 a (0,023 / 5,60)	6,27	24,34
	2	0,382 a (0,015 / 3,85)	6,25	24,64
	3	0,399 a (0,034 / 9,29)	6,63	23,90
Aplicação via folha	1	0,402 a (0,004 / 0,96)	5,46	22,61
	2	0,375 a (0,007 / 1,85)	5,77	21,12
	3	0,347 a (0,014 / 4,027)	4,66	22,33

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

¹ Valores referentes a desvio padrão(g/cm³;) e coeficiente de variação (%), respectivamente.

Santos et al. (2011) trabalhando com madeira de *Astronium* sp. relataram correlações altas (>0,89) entre densidade básica da madeira e o comprimento e espessura da parede das fibras e diâmetro dos vasos. Neste estudo, melhores correlações com a densidade básica foram observadas entre a espessura de parede ($r_{x,y} = 0,66$) e altura de raios ($r_{x,y} = -0,45$) e ainda assim essas correlações foram fracas.

Apesar da impossibilidade de aplicação de teste estatístico nota-se que de uma forma geral maior teor de extrativos totais são observados nas plantas

que receberam hormônio via sistema radicular, seguido das plantas que receberam hormônio via pulverização foliar, e por fim pelas plantas controle. Relativo ao teor de lignina nota-se que maiores valores são observados nas plantas do tratamento controle, seguido das plantas que receberam hormônio via sistema radicular e por fim as plantas que receberam hormônio via pulverização foliar.

Partindo do pressuposto que apenas IAA tenha sido transportado nos tratamentos com aplicação hormonal via sistema radicular e que ambos (IAA e GA) tenham sido transportados nos tratamentos com aplicação hormonal via pulverização foliar (conforme discutido na seção 3.1), podemos supor que altas concentrações de IAA em relação aos demais hormônios promovem aumento na biossíntese dos compostos secundário. Trabalhos com quantificação da produção de óleos por plantas medicinais apoiam essa ideia. Povh (2008) estudando *Salvia officinalis* verificou que as plantas tratadas com auxina apresentaram o maior teor de óleo essencial que aquelas tratadas com GA, citocinina ou Stimulate® (giberelina + cinetina + auxina), e esses últimos apresentaram aumento no teor de óleos essenciais em comparação à testemunha.

Os extrativos possuem funções tanto fisiológicas como tecnológicas. Fisiologicamente são responsáveis, são importantes como fontes de energia e proteção contra ataques de microrganismos ou insetos (ESAU, 1974). Enquanto que tecnologicamente, de acordo com Buchanan (1981) e Oliveira et al. (2005), estão entre os principais responsáveis pela resistência da madeira ao ataque de fungos e insetos. Além disso, dependendo de sua constituição, pode aumentar o poder calorífico da madeira e, por outro lado pode ser considerado um problema na indústria de papel e celulose (BURGER; RICHTER, 1991).

Segundo Aloni, Tollier e Monties (1990) ambos giberelina e auxina regulam a biossíntese da lignina. Os dados encontrados nesse estudo parecem corroborar com esse autor e também com os resultados obtidos por Pereira

(2005) em que plantas de eucaliptos tratadas com GA₃ apresentaram menor teor de lignina, e também com Monteiro (2005) que observou diminuição da taxa de lignificação nas plantas que receberam aplicações de uma auxina sintética. Os resultados obtidos neste estudo mostram um possível sinergismo entre GA e IAA na redução da lignificação, uma vez que as plantas que receberam hormônios via pulverização foliar apresentaram menores teor de lignina, isso considerando o não transporte de GA nas plantas que receberam hormônio via sistema radicular e o transporte de IAA + GA nas plantas que receberam hormônio via pulverização foliar (conforme discutido na seção 3.1).

Para fins tecnológicos, madeiras com maiores teores de lignina resultam em carvão com melhor poder calorífico (JARA, 1989), desta forma a aplicação hormonal não seria interessante. Entretanto, no processo de produção da polpa celulósica alto teor de lignina implica maior gasto de reagentes, o que faz que seja indesejável para esse fim (GOMIDE, 2006), assim a aplicação de hormônios pode ser uma prática interessante.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso dos reguladores vegetais foi capaz de alterar o crescimento volumétrico sem alterações estatisticamente significativas na densidade básica (TABELA 8). O volume nas plantas do tratamento 2 com aplicação hormonal via pulverização foliar foi aproximadamente três vezes maior que nas plantas do controle (FIGURA 1).

A alocação de recursos [biomassa que constitui cada órgão da planta em relação à planta inteira, conforme Poorter e Nagel (2000) é um fator decisivo não só para o crescimento como para o sucesso competitivo (LAMBERS; CHAPIN III; PONS, 1998; PRITCHARD et al., 1999), uma vez que representa o investimento das plantas nos órgãos responsáveis pela captação dos recursos. Em termos práticos, nota-se que a aplicação hormonal via sistema radicular não promoveu grandes alterações na partição e alocação de massa seca na parte aérea da planta (FIGURA 3). No entanto, influenciou significativamente no desenvolvimento das raízes, em que maior acúmulo de massa seca para tal compartimento ocorreu no tratamento 2 (TABELA 4). Desta forma, desejando-se maior desenvolvimento de raízes (maior partição e alocação de massa seca para as raízes) a dosagem ótima estará próxima à dosagem utilizada no tratamento 2 e a aplicação dos hormônios deverá ser via sistema radicular. A aplicação hormonal via pulverização foliar promoveu grandes alterações na partição e alocação de massa seca (FIGURA 3). Desta forma, desejando-se maior partição e alocação de massa seca para o fuste a dosagem ótima estará entre a dosagem utilizada no tratamento 1 e no tratamento 2 e a aplicação dos hormônios deverá ser via pulverização foliar.

Os reguladores também foram capazes de alterar as características anatômicas e químicas da madeira. Segundo Salisbury e Ross (1992) a resposta da planta aos reguladores vegetais depende de alguns fatores como: a espécie, parte da planta, estágio de desenvolvimento, concentração, interação entre outros

reguladores e vários fatores ambientais que também estão envolvidos em processos de crescimento e desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo devem ser analisados sob a ótica das condições envolvidas no trabalho. No entanto, pelo menos com relação à altura das plantas, espera-se que tenha efeitos similares (respeitando a fisiologia de crescimento) em plantas com idades superiores, uma vez que trabalho realizado por Aloni (1985) com *Eucalyptus camaldulensis* com 10 meses de idade e utilizando 1 e 10 mg de IAA e GA/kg de massa fresca, respectivamente, demonstrou haver acréscimo de 30% na altura da planta.

Em síntese podemos afirmar que:

- a) Aplicação exógena de IAA e GA via pulverização foliar foi capaz de:
 - Aumentar consideravelmente o crescimento em termos volumétricos agindo principalmente no aumento do número de células, mas também pelos aumentos nas dimensões celulares.
 - Alterar a partição e alocação de fotoassimilados (massa seca) entre os compartimentos da planta.
- b) Aplicação exógena de IAA e GA via sistema radicular foi capaz de aumentar levemente o crescimento em termos volumétricos agindo principalmente no aumento das dimensões celulares.
- c) A variação das dimensões dos elementos celulares ao longo do caule é controlada pelos gradientes longitudinais de concentração hormonal.
- d) A aplicação hormonal exógena foi capaz de promover o aumento nas dimensões média dos elementos celulares em plantas intactas de *Eucalyptus*.

- e) Há fortes evidências que GA estimula a divisão celular do meristema apical e cambial e alargamento das fibras, enquanto que IAA parece agir no alongamento das fibras e deposição da parede celular secundária.

REFERÊNCIAS

- ALONI, R. Differentiation of vascular tissues. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 179-204, 1987.
- ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, p. 22-34, 2001.
- ALONI, R. The induction of vascular tissues by auxin. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 471-492.
- ALONI, R. **Plant growth method and composition**. US Patent n. 4507144, 14 Mar. 1983, 26 Mar. 1985.
- ALONI, R. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 63, p. 609-614, 1979.
- ALONI, R. et al. Hormonal control of vascular differentiation in plants: the physiological basis of cambium ontogeny and xylem evolution. In: SAVIDGE, R. A.; BARNETT, J. R.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation: experimental biology reviews**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 223-236.
- ALONI, R.; TOLLIER, M. T.; MONTIES, B. The role of auxin and gibberellin in controlling lignin formation in primary phloem fibers and in xylem of *Coleus blumei* stems. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 94, p. 1743-1747, 1990.
- ALONI, R.; ZIMMERMANN, M. H. The control of vessel size and density along the plant axis: a new hypothesis. **Differentiation**, New York, v. 24, p. 203-208, 1983.
- ANFODILLO, T. et al. Widening of xylem conduits in a conifer tree depends on the longer time of cell expansion downwards along the stem. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 837-845, Oct. 2011.
- AREND, M.; FROMM, J. Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 255-264, 2003.
- ASSIS, T.F. **Melhoramento para produtividade e qualidade de celulose de fibra curta**. Disponível em:

<<http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/Arquivo%2008%20Estrat%E9%20E9gias%20de%20Melhoramento%20FIBRA%20CURTA.doc>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 11941:** madeira: determinação da densidade básica. Rio de Janeiro, 2003. 6 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL. **Normas técnicas.** São Paulo, 1974. 6 p.

AYALA-SILVA, T. et al. Effect of two growth regulators on yield and fiber quality and quantity in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Plant Growth Regulation Society of America Quarterly**, Chicago, v. 33, p. 90-100, 2005.

BECKER, P.; GRIBBEN, R. J.; LIM, C. M. Tapered conduits can buffer hydraulic conductance from path-length effects. **Tree Physiology**, Oxford, v. 20, n. 14, p. 965-967, Aug. 2000.

BENICASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas:** noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.

BJÖRKLUND, S. et al. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 499-511, 2007.

BOOTH, A. et al. Effects of indolyl-3-acetic acid on the movement of nutrients within plants. **Nature**, London, v. 194, p. 204-205, 1962.

BRADLEY, M. V.; CRANE, J. C. Gibberellin-stimulated cambial activity in stems of apricot spur shoots. **Science**, New York, v. 126, p. 972-973, 1957.

BUCHANAN, M. A. **Extraneous components of wood:** the chemistry of wood. New York: R. Krieger, 1981. 689 p.

BURGER, L. M.; RICHTER, H. A. Anatomia da madeira. São Paulo: Nobel, 1991. 154 p.

CASPER, J. A.; TAYLOR, B. H. Growth and development of young 'Loring' peach trees after foliar sprays of paclobutrazol and GA₃. **Hortscience**, Alexandria, v. 24, n. 2, p. 240-242, 1989.

CASTRO, P. R. C. Análise de crescimento e produção da soja (*Glycinemax* cv. Davis) sob efeito de fitoreguladores. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 33, p. 1346-1349, 1981.

CASTRO, P. R. C.; FACHINELLO, J. C. **Aplicação de reguladores vegetais em fruticultura**. Piracicaba: USP-ESALQ, 1993. 43 p. (Boletim Técnico, 2).

CHO, H. T.; KENDE, H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1661-1671, 1997.

CLELAND, R. E. The final action of hormones: auxin and cell elongation. In: PETER, J.; DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Ithaca: Springer, 2010. p. 204-220.

COPUR, O. U. et al. Effect of different defoliant and application times on the yield and quality components of cotton in semi-arid conditions. **African Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 14, p. 2095-2100, Apr. 2010.

COSGROVE, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular basis of extensible walls and cell enlargement. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1031-1041, 1997.

DADSWELL, H. E. **The anatomy of eucalypto woods**. Melbourne: CSIRO-Forest Products Laboratory, Division of applied Chemistry Technological, 1972. 39 p.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** 2nd ed. London: Kluwer Academic, 2004. p. 1-15.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 1-12.

DEBOER, A. H.; VOLKOV, V. Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. **Plant Cell Environment**, New York, v. 26, n. 1, p. 87-101, Jan. 2003.

DEMUNER, B. J.; BERTOLUCCI, F. L.G. Seleção florestal: uma nova abordagem a partir de estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos para características de madeira e polpa de eucalypto. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL DA ABTCP, 26., 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABTCP, 1993. 1 CD-ROM.

DIGBY, J.; WAREING, P. F. The effect of applied growth hormones on cambial division and the differentiation of the cambial derivatives. **Annals of Botany**, London, v. 30, p. 539-549, 1966.

DOLEY, D.; LEYTON, L. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of secondary xylem in *Fraxinus*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 67, p. 579-594, 1968.

DOURADO NETO, D. et al. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

DUA, A. et al. CO₂ exchange, primary photochemical reactions and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in Brassica pods during water stress and recovery. **Photosynthetica**, Prague, v. 30, p. 261-268, 1994.

EL-SHOUBAGY, M. N.; ABDEL-GHAFFAR, B. A.; EL-NAGGAR, R. A. Effect of IAA and GA₃ on the anatomical characteristics, straw and fiber yield and quality of flax. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 174, p. 21-26, 1995.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blucher, 1974. 293 p.

FOELKEL, C. **Elementos de vaso e celuloses de eucalipto**. 2007. Disponível em: <<http://www.eucalyptus.com.br/disponiveis.html>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

FU, X.; HARBERT, N. P. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. **Nature**, London, v. 421, p. 740-743, 2003.

GERSANI, M.; LIPS, S. H.; SACHS, T. The influence of shoots, roots and hormones on sucrose distribution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, p. 177-184, 1980.

GOLDSHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWING, C. H. (Ed.). **Lignis: occurrence, formation, structure and reations**. New York: J. Wiley, 1971. p. 241-266.

GOMIDE, J. L. **Tecnologia e química da produção de celulose**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, São Paulo, v. 47, n. 8, p. 36-38, 1986.

GOULART, M. et al. Massa específica básica e massa seca de madeira de *Eucalyptus grandis* sob o efeito do espaçamento de plantio e da posição axial no tronco. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 167-175, 2003.

GUEHL, J.; AUSSÉNAC, G. Photosynthesis decrease and stomatal control of gas exchange in *Abies Alba* Mill. in response to vapour pressure difference. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 316-322, 1987.

HANSEN, H.; GROSSMANN, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1437-1448, 2000.

ISRAELSSON, M. et al. Changes in gene expression in the wood-forming tissue of transgenic hybrid aspen with increased secondary growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 893-903, 2003.

ISRAELSSON, M.; SUNDBERG, B.; MORITZ, T. Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signaling genes in wood-forming tissues in aspen. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, p. 494-504, 2005.

JARA, E. R. P. **O poder calorífico de algumas madeiras que ocorrem no Brasil**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1989. 6 p. (Comunicação Técnica, 1797).

JUNGHANS, U. et al. Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 5, p. 1-8, 2004.

KICHEVA, M. I.; TSONEV, T. D.; POPOVA, L. P. Stomatal and nonstomatal limitations to photosynthesis in the wheat cultivars subjected to water stress. **Photosynthetica**, Prague, v. 30, p. 107-116, 1994.

LALONDE, S. et al. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 37-56, 2003.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. Growth and allocation. In: _____. **Plant physiological ecology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. p. 299-351.

LAWLOR, D.W. Photosynthesis, productivity and environment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 1449-1461, 1995.

LEITCH, M. A. Vessel-element dimensions and frequency within the most current growth increment along the length of *Eucalyptus globules* stems. **Trees**, Berlin, v. 15, p. 353-357, 2001.

LEITCH, M. A.; SAVIDGE, R. A. Evidence for auxin regulation of bordered-pit positioning during tracheid differentiation in *Larix laricina*. **IAWA**, Leiden, v. 16, p. 289-297, 1995.

LEV-YADUN, S. Cellular patterns in dicotyledonous woods: their regulation. In: SAVIDGE, R.; BARNETT, J. R.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 315-324.

LEV-YADUN, S. **Differentiation of the ray system in woody plants**. 1992. 84 p. Thesis (Ph.D. in Life Sciences)-Tel Aviv University, Tel Aviv, 1992.

LEV-YADUN, S.; ALONI, R. Differentiation of the ray system in woody plants. **Botanical Review**, Bronx, v. 61, p. 45-84, 1995.

LONG, S. P. et al. Can improvement in photosynthesis increase crop yields? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 315-330, 2006.

LORBIECKE, R.; SAUTER, M. Induction of cell growth and cell division in the intercalary meristem of submerged deepwater rice (*oryza Sativa* L.). **Planta**, Berlin, v. 204, p. 140-145, 1998.

LOWERTS, G.; WHEELER, E. A.; KELLISON, R. C. Characteristics of wound-associated wood of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). **Wood and Fiber Science**, Madison, v. 18, p. 537-552, 1986.

LUU, D. T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 85-96, 2005.

MA, H. C. et al. Photosynthetic response of *Populus euphratica* to salt stress. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 93, p. 55-61, 1997.

MACFARLANE, C.; WHITE, D. A.; ADAMS, M. A. The apparent feed-forward response to vapour pressure deficit of stomata in droughted, Field-grown *Eucalyptus glóbulos* Labill. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, p. 1268-1280, 2004.

MASOJIDEK, J. et al. The synergistic effect of drought and light stresses in sorghum and pearl millet. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, p.198-207, 1991.

MAURI, R. **Anatomia e densidade do lenho de clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, com variação de altitude e de topografia, no Estado de Minas Gerais**. 2010. 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.

MCKENZIE, R. R.; DEYHOLOS, M. K. Effects of plant growth regulator treatments on stem vascular tissue development in linseed (*Linum usitatissimum* L.). **Industrial Crops and Products**, London, v. 34, n. 1, p. 1119-1127, July 2011.

MELONI, D. A. et al. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 49, p. 69-76, 2003.

MODESTO, J. C.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Efeito do ácido giberélico sobre o comprimento e diâmetro do caule de plântulas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 2/3, p. 7-12, 1996.

MONTAGU, K. D.; KEARNEY, D. E.; SMITH, R. G. B. The biology and silviculture of pruning planted eucalypts for clear wood production: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 179, p. 1-13, 2003.

MONTEIRO, M. B. O. **Modulação do processo de lignificação por aplicação de ácido jasmônico e 2,4- diclorofenoxiacético em *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 2005. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

MORECROFT, M. D.; ROBERTS, J. M. Photosynthesis and stomatal conductance of mature canopy Oak (*Quercus robur*) and Sycamore (*Acer pseudoplatanus*) trees throughout the growing season. **Functional Ecology**, London, v. 13, p. 332-342, 1999.

MULLINS, M. G. Hormone-directed transport of assimilates in decapitated internodes of *Phaseolus vulgaris* L. **Annals of Botany**, London, v. 34, p. 897-909, 1970.

MUNERI, A.; RAYMOUND, C. A. Nondestructive sampling of Eucalyptus glóbulos and E. nitens for wood properties: II, fiber length and coarseness. **Wood Science and Technology**, Berlin, v. 35, n. 1/2, p. 41-56, 2001.

NAGEL, O. W.; KONINGS, H.; LAMBERS, H. Growth rate and biomass partitioning of wild-type and low-gibberellin tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at a high and low nitrogen supply. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, p. 33-39, 2001.

NAGEL, O. W.; LAMBERS, H. Changes in the acquisition and partitioning of carbon and nitrogen in the gibberellin-deficient mutants A70 and W335 of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 883-891, 2002.

NISHITANI, K. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. In: JEON, K. W. (Ed.). **International review of cytology: a survey of cell biology**. San Diego: Elsevier, 1997. v. 173, p. 157-206.

OLIVEIRA, J. T. da S. et al. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 5, p. 819-826, 2005.

PATRICK, J. W. An assessment of auxin-promoted transport in decapitated stems and whole shoots of *Phaseolus vulgaris* L. **Planta**, Berlin, v. 146, p. 107-112, 1979.

PEREIRA, R. P. W. **Atenuação do processo de lignificação em Eucalyptus grandis (Hill ex Maiden) por GA₃ e BAP**. 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

PETIT, G.; ANFODILLO, T.; ZAN, C. Degree of tapering of xylem conduits in stems and roots of small Pinus cembra and Larix decidua trees. **Botany**, Ottawa, v. 87, n. 5, p. 501-508, May 2009.

PHILIPSON, W. R.; WARD, J. M.; BUTTERFIELD, B. G. **The vascular cambium: its development and activity**. London: Chapman & Hall, 1971. 182 p.

POORTER, H.; NAGEL, O. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 27, p. 595-607, 2000.

POVH, J. A. **Reguladores vegetais e bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.:** avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas. 2008. 108 p. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PRITCHARD, S. G. et al. Elevated CO₂ and plant structure: a review. **Global Change Biology**, Oxford, v. 5, p. 807-837, 1999.

QUICK, W. P. et al. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 15, p. 25-35, 1992.

R CORE TEAM. **R:** a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 maio 2016.

RIDOUTT, B. G.; PHARIS, R. P.; SANDS, R. Fibre length and gibberellins A1 and A20 are decreased in *Eucalyptus globulus* by acylcyclohexanedione injected into the stem. **Physiology Plant**, Bethesda, v. 96, p. 559-566, 1996.

ROBERTS, L. W.; GAHAN, B. P.; ALONI, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 154 p.

ROCHA, F. T.; FLORSEM, S. M. B.; COUTO, H. T. Z. Variação das dimensões dos elementos anatômicos da madeira de árvores de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden aos sete anos. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 43-55, 2004.

ROMANO, C. P.; COOPER, M. L.; KLEE, H. J. Uncoupling auxin and ethylene effects in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 181-189, 1993.

ROSS, J. J. et al. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, p. 547-552, 2000.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Wadsworth, 1992. 682 p.

SAMANTARAI, B.; NANDA, B. K. Evaluation of the role of hormonal factors in secondary growth of dicots. **Botanical Magazine Tokyo**, Tokyo, v. 93, p. 13-22, 1979.

SANQUETTA, C. R. et al. Produção de madeira livre de nós em povoamentos de *Pinus taeda* em função da densidade de plantio. **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 129-140, 2003.

SANTOS, C. M. et al. A densidade básica e características anatômicas variam radialmente na madeira de *Astronium graveolens* Jacq. (Anacardiaceae). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 191-201, dez. 2011.

SAVIDGE, R. A. Intrinsic regulation of cambial growth. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 20, p. 52-77, 2000.

SCHMUTZ, U. Effect of salt stress (NaCl) on whole plant CO₂-gas exchange in mango. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 509, n. 1, p. 269-276, 2000.

SID AHMED, O. A. Effects of different levels of gibberellic acid (GA₃) on growth of sour orange (*Citrus aurantium* L.) seedlings. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 84, p. 165-169, 1978.

SMITH, F. H. Effects of balsam woolly aphid (*Adelges piceae*) infestation on cambial activity in *Abies grandis*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 54, n. 10, p. 1215-1223, 1967.

SNOW, R. Activation of cambial growth by pure hormones. **New Phytologist**, Cambridge, v. 34, p. 347-360, 1935.

SORCE, C. et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant Cell**, Rockville, v. 32, n. 6, p. 885-898, Apr. 2013.

SPONSEL, V. M.; HEDDEN, P. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!** Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 63-94.

SUNDBERG, B.; UGGLA, C.; TUOMINEN, H. Cambial growth and auxin gradients. In: SAVIDGE, R.; BARNETT, J.; NAPIER, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of wood formation**. Oxford: BIOS Scientific, 2000. p. 169-188.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TANIMOTO, E. Gibberellin-dependent root elongation in *Lactuca sativa*: recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of GA₃. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 28, p. 963-973, 1987.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 54, p. 163-170, 2007.

TUOMINEN, H. et al. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 115, p. 577-585, 1997.

UGGLA, C. et al. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 9282-9286, 1996.

UGGLA, C.; MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 113-121, 1998.

VALENTE, B. M. R. T. et al. Variabilidade radial e longitudinal das propriedades físicas e anatômicas da madeira de angico-vermelho. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 100, p. 485-496, dez. 2013.

VERA-ESTRELLA, R. et al. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 2318-2329, 2004.

VIEIRA, A. H. et al. **Influência da desrama artificial sobre o crescimento da teca (*Tectona grandis*) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2010.4 p.(Circular Técnica, 114).

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.

WAREING, P. F. Interaction between indole-acetic acid and gibberellic acid in cambial activity. **Nature**, London, v. 151, p. 1744-1745, 1958.

WAREING, P. F.; HANNEY, C. E. A.; DIGBY, J. The role of endogenous hormones in cambial activity and xylem differentiation. In: ZIMMERMANN, M. H. (Ed.). **The formation of wood in forest trees**. New York: Academic, 1964. p. 323-344.

WOLBANG, C. M. et al. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, p. 769-776, 2004.

WOLBANG, C. M.; ROSS, J. J. Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 153-157, 2001.

WU, Y.; COSGROVE, D. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1543-1553, 2000.

YANG, T.; DAVIES, P. J.; REID, J. B. Genetic dissection of the relative roles of auxin and gibberellin in the regulation of stem elongation in intact light-grown peas. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, p. 1029-1034, 1996.

YAXLEY, J. R. et al. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 125, p. 627-633, 2001.

CAPÍTULO 3 METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE IAA EM TECIDOS DA ZONA CAMBIAL

RESUMO

Ácido indol-3 acético (IAA) tem sido demonstrado para afetar a maioria dos aspectos do crescimento cambial secundário. O conhecimento detalhado do transporte e distribuição do IAA permitiria elucidar seu papel na atuação como um morfógeno. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas acessíveis para sua detecção a níveis extremamente baixos em tecidos da zona cambial. Assim, teve-se como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia capaz de quantificar o hormônio auxina em pequenas amostras de tecidos da zona cambial. As análises foram realizadas utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), equipado com uma interface de ionização por electropulverização (ESI). O espectrômetro utilizado foi um triploquadropolo. Utilizou-se um gradiente de eluição de fase reversa, com uma fase móvel aquosa (contendo 0,5% de ácido fórmico) modificado por meio de metanol. A extração foi realizada a partir de criosecções com espessura de 30 μm utilizando-se acetona. O limite de quantificação do método foi na ordem de PPB (parte por bilhão).

Palavras-chave: Ácido indol-3 acético. LC-MS/MS. Câmbio vascular.

CHAPTER 3 METHODOLOGY FOR THE QUANTIFICATION OF IAA IN CAMBIAL ZONE TISSUES

ABSTRACT

Indol-3-acetic acid (IAA) has been demonstrated to alter most aspects of secondary cambial growth. The detailed knowledge of the transportation and distribution of IAA would allow us to elucidate its role as morphogen. Thus, it is necessary to develop accessible techniques for its detection at extremely low levels in cambial one tissues. Therefore, this work aimed at developing a methodology capable of quantifying the hormone auxin in small samples of cambial zone tissues. The analysis were conducted using the sequential high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS), equipped with electrospray ionization interface (ESI). The electrometer used was a triple quadrupole. A reverse phase elution gradient, with an aqueous mobile phase (containing 0.5% formic acid), modified by methanol medium, was used. The extraction was performed using cryosections with 30 μm of thickness, using acetone. The quantification limit of the method was in the order of ppb (part per billion).

Keywords: Indol-3-acetic acid. HPLC/MS. Vascular cambium.

1 INTRODUÇÃO

A plasticidade do desenvolvimento das plantas de acordo com as mudanças nas condições de crescimento é mediada por moléculas sinalizadoras denominadas hormônios. As principais classes de hormônios vegetais são: auxina, giberelina, ácido abscísico e etileno (DAVIES, 1995). Dentre esses, o mais importante é o ácido 3 – indolacético (IAA).

IAA é um organizador chave do crescimento e desenvolvimento do câmbio vascular (ROBERTS; GAHAN; ALONI, 1988). Em plantas intactas, o fluxo de IAA polar é essencial para a iniciação de padrões espacialmente organizados dos tecidos vasculares, bem como para a manutenção do câmbio vascular. Além disso, IAA tem sido demonstrado para afetar a maioria dos aspectos do crescimento cambial secundário, incluindo a divisão celular, determinação/diferenciação, dimensões das células, espessamento da parede secundária e lignificação (LITTLE; PHARIS, 1995).

Segundo Uggla et al. (1996) a incapacidade de desenvolver um conceito unificador para o papel de IAA na regulação dos padrões dos tecidos vasculares é devido a um conhecimento limitado não só dos mecanismos de percepção e metabolismo do IAA, mas também do seu transporte e distribuição final. O conhecimento detalhado do transporte e distribuição do IAA permitiria elucidar seu papel na sinalização de posição, ou seja, permitiria verificar seu papel na atuação como um morfógeno. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas acessíveis e relativamente baratas para detecção do IAA a níveis extremamente baixos em tecidos da zona cambial.

Desde a identificação do IAA como a principal auxina em plantas, houve um desenvolvimento contínuo de métodos para medir a sua concentração endógena nos tecidos da planta. Alguns métodos foram descritos em que quantidades a nível de picogramas de IAA podem ser detectadas, por exemplo, em HPLC com detecção por fluorescência (CROZIER et al., 1980) e técnicas

imunológicas (MALDINEY et al., 1986). No entanto, quando aplicados a extratos de plantas, estes métodos ainda exigem purificação para assegurar que a resposta detectada é precisa, uma vez que o extrato de plantas é uma mistura complexa de múltiplos componentes. Assim, mais recentemente, técnicas de GC-MS para quantificação de IAA em extratos semi-purificados de plantas permitiram medições precisas de níveis baixos de IAA em extratos com massa de 1 mg ou menos (EDLUND et al., 1995; UGGLA et al., 1996). No entanto, essa técnica exige o uso de moléculas de IAA marcadas com carbono radioativo, o que eleva os custos da análise.

Uma técnica atrativa para detecção e quantificação de IAA em extratos com massa de aproximadamente 10 mg obtidas a partir da zona cambial de árvores é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em série (LC-MS/MS). Essa técnica, em virtude do alto grau informativo das análises, pode ser utilizada para análises quantitativas onde se buscam determinar analitos em níveis de traços em matrizes complexas. Além disso, LC-MS/MS possibilita eliminar interferências espectrais e minimizar o problema de co-eluição de substâncias encontradas.

Desta forma, teve-se como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em série (LC-MS/MS) capaz de quantificar o hormônio auxina em pequenas amostras de tecidos da zona cambial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação de amostras para análise hormonal

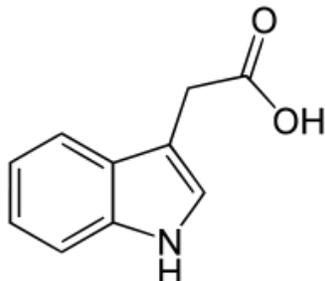
Bloco de madeira com aproximadamente 3 x 3 x 3 cm, consistindo de tecidos de floema e xilema, foi retirado à altura do peito durante o mês de setembro de 2015 (período de crescimento no hemisfério sul) de árvores do híbrido clonal *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Após a retirada do bloco, o mesmo foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, transportados em gelo seco e posteriormente armazenado a -75°C.

Em laboratório realizou-se a preparação da amostra para análise hormonal. Primeiramente, com auxílio de uma micro serra de disco flexível diamantado dupla face segmentado (Sorensen, Discoflex) realizou-se desbaste do bloco de madeira a uma dimensão de aproximadamente 5 x 15 x 20 mm de largura, altura e profundidade respectivamente. O bloco desbastado foi então crio-seccionado consecutivamente a partir do floema para o xilema utilizando um criostato (HM 505 E microtome - Microm Laborgeräte, Walldorf, Alemanha) arrefecido a -19°C regulado para produzir secções 30µm de espessura. Para determinação da posição radial das secções tangenciais, secções transversais foram cortadas da extremidade do bloco. A secção transversal foi então montada em glicerina e inspecionada sob microscópio.

2.2 Reagentes

O padrão do fitormônio IAA (pureza >99,9%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A Figura 1 mostra a estrutura química do IAA. Foram utilizados metanol (grau HPLC) e ácido fórmico e acetona (grau analítico). Água ultrapura foi utilizada em toda a análise. Papel de filtro (Whatman, 12,5 cm, No. 542) e membranas filtrantes PTFE de 0,22µm foram utilizados.

Figura 1 - Fórmula estrutural do ácido acético-3-indol.



2.3 Procedimento para quantificação do hormônio IAA

Para quantificação do hormônio IAA faz-se necessários um método para extração da substância (IAA) do material vegetal (criosecções de tecido da zona cambial), preparação de soluções analíticas, bem como definição de condições ótimas de operação do equipamento para detecção do IAA e por fim definição de métodos de validação da metodologia de análise

2.3.1 Método de extração

Criosecções, obtidas conforme descrito na sessão 2.1, foram maceradas em almofariz de ágata com o auxílio de um pistilo de ágata e transferidos para frascos do tipo eppendorff. Em seguida, adicionou-se 2,0mL de acetona. Os frascos, contendo a amostra macerada e acetona, foram fechados e submetidos ao ultrassom por 50 minutos. Posteriormente evaporou-se a acetona no equipamento speedvac, utilizando centrifugação e vácuo a 45°C. Por fim, realizou-se a ressuspensão da amostra adicionando-se 2,0mL do diluente metanol:água mili-q (80:20 - v:v) com 0,1% de ácido fórmico.

2.3.2 Preparo das soluções analíticas

Para o preparo das soluções estoque, trabalho e controle utilizaram-se como diluente solução de metanol, água mili-q e ácido fórmico. O preparo do

diluyente consistiu na homogeneização de 200 mL de água mili-q e 800 mL de metanol em uma proveta de 1000 mL com tampa, seguido da adição de 1mL de ácido fórmico, homogeneização, filtragem por membrana filtrante PTFE de 0,22 μm e transferência para um frasco com tampa.

A solução estoque de IAA foi realizada pela pesagem de aproximadamente 10,0 mg do padrão de IAA que posteriormente foi transferido para um balão volumétrico de 100,0 mL. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 50,0 mL de diluyente e manteve-se em banho ultrassônico até completa dissolução. A solução foi então resfriada à temperatura ambiente e o volume do balão volumétrico foi completado com diluyente e homogeneizado, obtendo-se assim, solução na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

O preparo da solução de trabalho consistiu na transferência de uma alíquota de 0,1 mL de solução estoque para balão volumétrico de 10 mL, seguido da adição de diluyente até completar o volume. Obtendo-se assim, solução de trabalho na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$.

As soluções controle foram preparadas conforme soluções descritas anteriormente.

2.3.3 Otimização das condições do espectrômetro de massas e UPL

As análises foram realizadas utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Acquity, Waters) acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). O espectrômetro utilizado foi um triploquadrupolo (TQD, Waters). Os dados foram processados pelo software do sistema de acompanhamento (Masslynx, versão 4.1 SCN805).

As condições de operação do espectrômetro de massas, voltagens de cone e colisão foram otimizadas no modo MRM. A seguir, estão descritos os principais parâmetros do sistema cromatográfico LC-MS/MS que foram otimizados para a determinação do composto em estudo.

As fases móveis utilizadas foram:

- a) Solução A – transferem-se 900 mL de água milli-q para um balão volumétrico de 1000 mL, em seguida, adicionam-se 5 mL de ácido fórmico. Posteriormente, completa-se o volume do balão volumétrico com água mili-q, homogeneíza, filtra-se através de membrana filtrante PTFE de 0,22 μm , transfere-se para um frasco com tampa e, finalmente, degaseifica-se a solução.
- b) Solução B – Transferem-se 900 mL de metanol para um balão volumétrico de 1000 mL, em seguida, completa-se o volume com metanol, homogeneíza, filtra-se através de membrana filtrante PTFE de 0,22 μm , transfere-se para um frasco com tampa e, finalmente, degaseifica-se a solução.

A Tabela 1 apresenta o programa de gradiente de eluição ótimo para a separação do componente deste estudo.

Tabela 1 - Condições de gradiente de cromatografia para a análise de IAA

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Solução A (%)	Solução B (%)
Inicial	0,2	81,0	19,0
2,5	0,2	10,0	90,0
4,5	0,2	10,0	90,0
5,00	0,2	10,0	90,0
5,5	0,2	81,0	19,0
6,0	0,2	81,0	19,0

A fim de se obterem as condições ótimas de análise do composto em estudo foram realizadas injeções diretas no espectrômetro de massas com solução analítica padrão (1 $\mu\text{g/mL}$ -1ppm).

Para transmissão e detecção dos íons, utilizou-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) com ionização por spray eletrônico (eletrospray) no modo íon positivo (ESI+). Para a quantificação do IAA selecionou-se o íon fragmento de maior abundância m/z 130. A Tabela 2 mostra as condições utilizadas para o estudo.

Tabela 2 - Condições utilizadas para o estudo.

Parâmetros da fonte de ionização	
Capilar (KV)	5,00
Cone (V)	25,0
Extrator (V)	3,00
Lentes RF (V)	0,1
Temperatura da fonte (°C)	120
Temperatura de dessolvatação (°C)	250
Fluxo de gás de dessolvatação (L/hr)	500
Fluxo de gás do cone (L/hr):	25
Parâmetros do analisador no modo MSMS	
Resolução LM 1	10
Resolução HM 1	10
Energia do íon 1	0,5
Entrada	1
Saída	0,5
Colisão	30
Resolução LM 2	10
Resolução HM 2	10
Energia do íon 2	0,5
Fluxo do Gás de Colisão	0,10
Gás de dessolvatação	Nitrogênio ultra puro
Gás de colisão	Argônio
UPL	
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 2,1x100mm 1,7 μ m
Temperatura da coluna (°C)	40°C
Temperatura da amostra °C	15
Fluxo (mL/min)	0,2
Tempo de corrida (min)	6

2.3.4 Validação parcial do método

O método foi validado parcialmente devido ao fato de não se possuir uma matriz sem ativo, a qual serviria para medir a influência dos componentes da matriz na extração ou recuperação do analito.

Os limites de detecção e quantificação do método (LDM e LQM) foram estabelecidos com base na relação sinal/ruído (S/R), no qual se aceita a estimativa de 3:1 para o LD e de 10:1 para o LQ.

A relação (S/R) foi calculada pelo software Masslynx, versão 4.1 SCN805 do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Acquity, Waters) acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (TQD, Waters). Para estabelecer essa relação para os valores dos LDI e LQI utilizou-se uma concentração conhecida com aproximadamente 1 µg/mL do padrão IAA.

Os resultados obtidos foram utilizados para estabelecer a relação (S/RO) cálculo de quantificação é realizado utilizando-se a expressão 1:

$$\text{Quantificação } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{AA} \times \text{MP} \times 0,1 \times \text{POT} \times 2}{\text{AP} \times 100 \times 10 \times 100 \times \text{MA}} \times 1000 \quad (1)$$

Onde:

AA = Área do pico do espectro no modo MRM de IAA obtida na solução amostra.

AP = Média das áreas dos picos dos espectros no modo MRM de IAA obtida na Solução Padrão;

MP = Massa do Padrão de IAA utilizada no preparo da Solução Padrão (mg);

POT = Potência do Padrão IAA (%).

Para a determinação da linearidade do método analítico construiu-se uma curva analítica com 7 diferentes concentrações do composto IAA, dentro da faixa de concentração de 10 a 70ng/mL.

O preparo da solução estoque de linearidade: 1) Solução A: pesar aproximadamente 10,0 mg do padrão de IAA e transferir para balão volumétrico 100,0 mL. Adicionar aproximadamente 50,0 mL de diluente e colocar em banho ultrassônico até completa dissolução. Resfriar à temperatura ambiente, completar o volume do balão com diluente e homogeneizar (Concentração: 100000 ng/mLde IAA); 2) Solução B: transferir uma alíquota de 0,1mL da Solução A para balão volumétrico 10,0 mL e completar o volume do balão com diluente (Concentração: 1000 µg/mLde IAA);

Os pontos da curva de linearidade foram contruídos como:

- a) Ponto 1 - Transferir uma alíquota de 0,1mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 10,0 ng/mLde IAA).
- b) Ponto 2 - Transferir uma alíquota de 0,2mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 20,0 ng/mLde IAA).
- c) Ponto 3 - Transferir uma alíquota de 0,3mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 30,0 ng/mL de IAA).
- d) Ponto 4 - Transferir uma alíquota de 0,4mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 40,0 ng/mL de IAA).
- e) Ponto 5 - Transferir uma alíquota de 0,5 mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 50,0 ng/mL de IAA).

- f) Ponto 6 - Transferir uma alíquota de 0,6mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 60,0 ng/mL de IAA).
- g) Ponto 7 - Transferir uma alíquota de 0,7 mL da solução B para balão volumétrico de 10,0 mL. Completar o volume do balão com o diluente e homogeneizar (Concentração: 70,0 ng/mL de IAA).

A linearidade do método foi verificada ajustando o modelo de regressão linear simples utilizando os pontos de 1 a 7.

Para determinação da repetitividade do método foram realizadas 6 medições da mesma amostra. As medições foram efetuadas utilizando o mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e em repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo.

Precisão intermediária foi quantificada com o objetivo de verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados. Realizaram-se 12 ensaios para se avaliar a precisão intermediária. A precisão intermediária, assim como a repetitividade, é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, que envolve a distribuição diferencial destes em um sistema heterogêneo bifásico (Fase Estacionária e Fase Móvel). A separação cromatográfica é obtida a partir de interações diferenciadas entre os analitos componentes da mistura, fase estacionária e fase móvel.

Por meio do sistema de classificação da Fase Estacionária tendo-se em vista sua polaridade é possível denominá-la em dois tipos:

- a) Cromatografia em Fase Normal: fase estacionária polar;
- b) Cromatografia em Fase Reversa: fase estacionária de baixa polaridade.

Devido à aplicação quase que universal da cromatografia em Fase Reversa C18, já que permite a análise desde substâncias hidrossolúveis e/ou iônicas até substâncias lipofílicas, este tipo de cromatografia foi escolhido para análise do fitormônio IAA conforme descrito na seção 2.3.3 e na Tabela 1. Além disso, utilizou-se o modo de eluição em gradiente, pois, ao se variar a proporção de Fase Móvel em função do tempo, desta forma, variando-se a polaridade que implica variação do fator de retenção, tem-se como consequência a seletividade na separação.

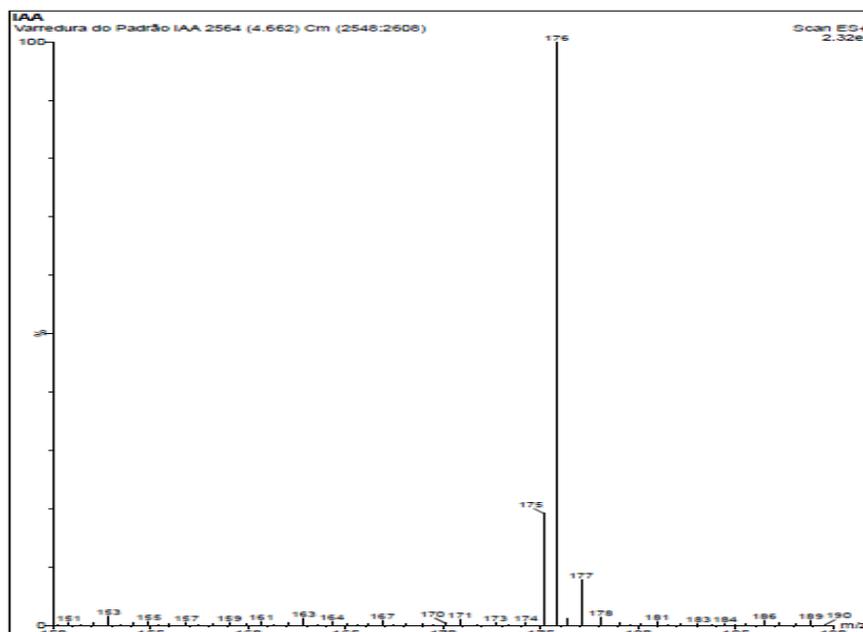
Tanto a acidificação realizada com ácido fórmico da Solução A quanto a acidificação da fase móvel tem como objetivo auxiliar na eficiência da ionização dos analitos no modo positivo (CALDAS et al., 2010; KUSTER; ALDA; BARCELÓ, 2006).

A fonte de ionização é a parte do equipamento responsável por converter os analitos de interesse em íons em fase gasosa, o qual é pré-requisito fundamental para qualquer análise por MS. A fonte de ionização mais

comumente utilizada para o acoplamento LC-MS é a de electrospray (ESI), descrita inicialmente por Fenn (YAMASHITA; FENN, 1984), a qual é a mais indicada para substâncias neutras ou polares, que podem ser protonadas ou deprotonadas em condições apropriadas de pH (ARDREY, 2003). A ionização pode ocorrer tanto no modo positivo quanto negativo, dependendo das características do analito de interesse. O IAA foi melhor ionizado por eletrospray no modo positivo (ESI+), conforme descrição de condições na Tabela 2.

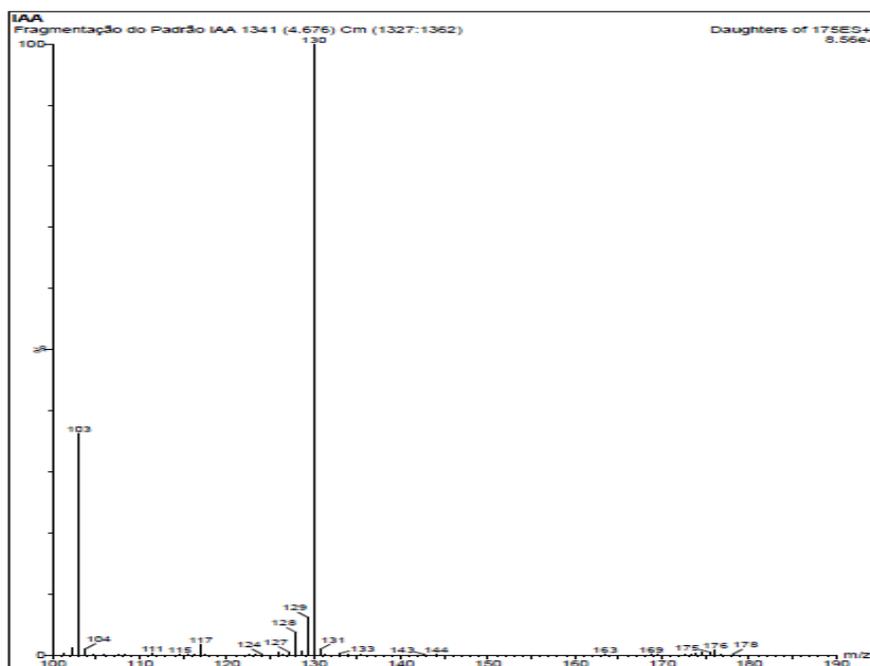
A molécula de IAA apresenta fórmula molecular de 175 Da e através da ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+) foi possível obter uma relação massa/carga de 176 (molécula de IAA com adição de um próton) conforme espectro do padrão de IAA apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Espectro de varredura através da ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+) do padrão de IAA.



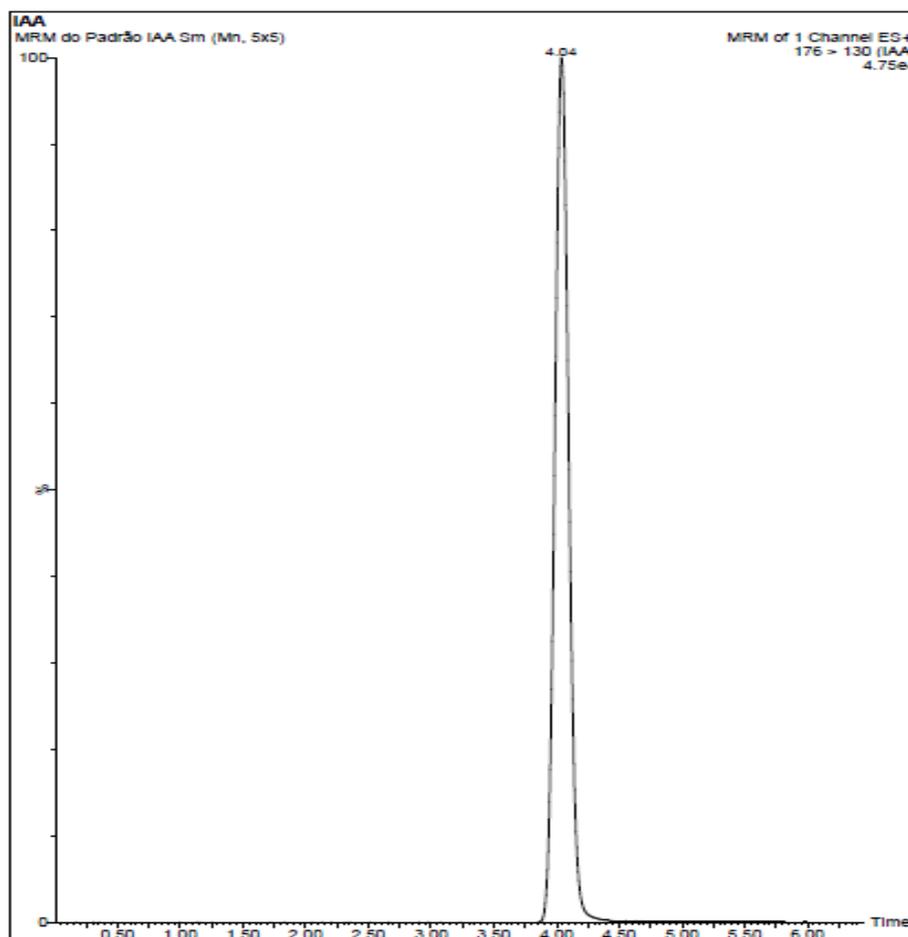
Após a ionização realizou-se a fragmentação do padrão de IAA por colisão do analito utilizando o gás argônio. O íon fragmento principal apresentou uma relação massa/carga (m/z) de 130, o que está de acordo com Ma et al. (2008). A Figura 3 apresenta o espectro de fragmentação do padrão de IAA obtido através da colisão com o gás argônio.

Figura 3 - Espectro de fragmentação do padrão de IAA obtido através da colisão com o gás argônio



Para fins quantitativos utilizou-se o modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizando o íon fragmento m/z 130 proveniente do íon precursor 176; conforme espectro apresentado na Figura 4. As transições de MRM para a detecção do composto foi escolhida a partir de experimentos de íons produto no espectrômetro de massas. Selecionou-se para os canais de MRM o íon de maior abundância.

Figura 4 - Espectro do padrão de IAA no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM).



A Figura 5 ilustra que IAA foi detectado a partir da metodologia de extração descrita na sessão 2.3.1 em crioseções do câmbio vascular, visto que o espectro de varredura através da ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+) apresentou uma relação massa/carga de 175. Posteriormente realizou-se a fragmentação da amostra por colisão utilizando o gás argônio. O íon fragmento principal apresentou uma relação massa/carga de 142, indicando assim que se

trata de um isômero de posição do padrão de IAA que apresentou como o íon fragmento principal m/z 130 (FIGURA 6).

Figura 5 - Espectro de varredura da amostra através da ionização por eletrospray no modo positivo (ESI+).

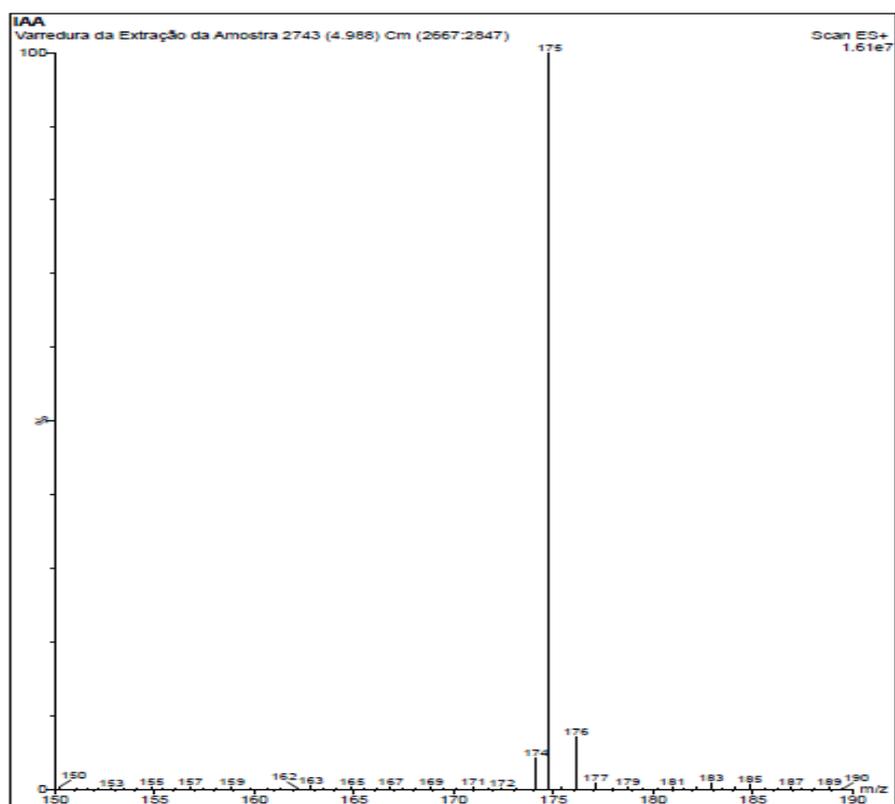
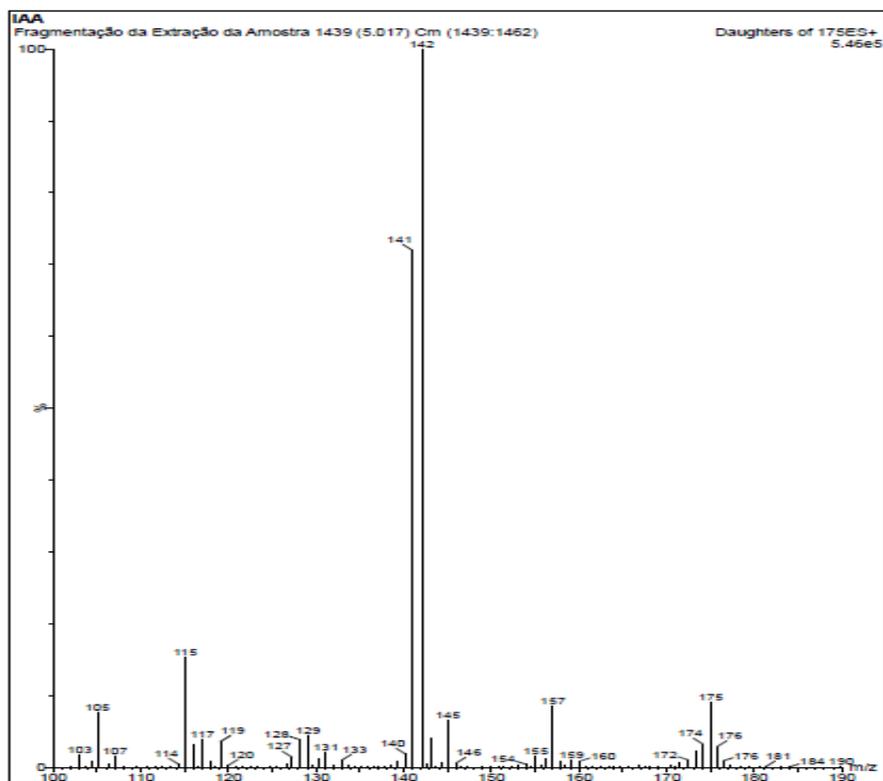
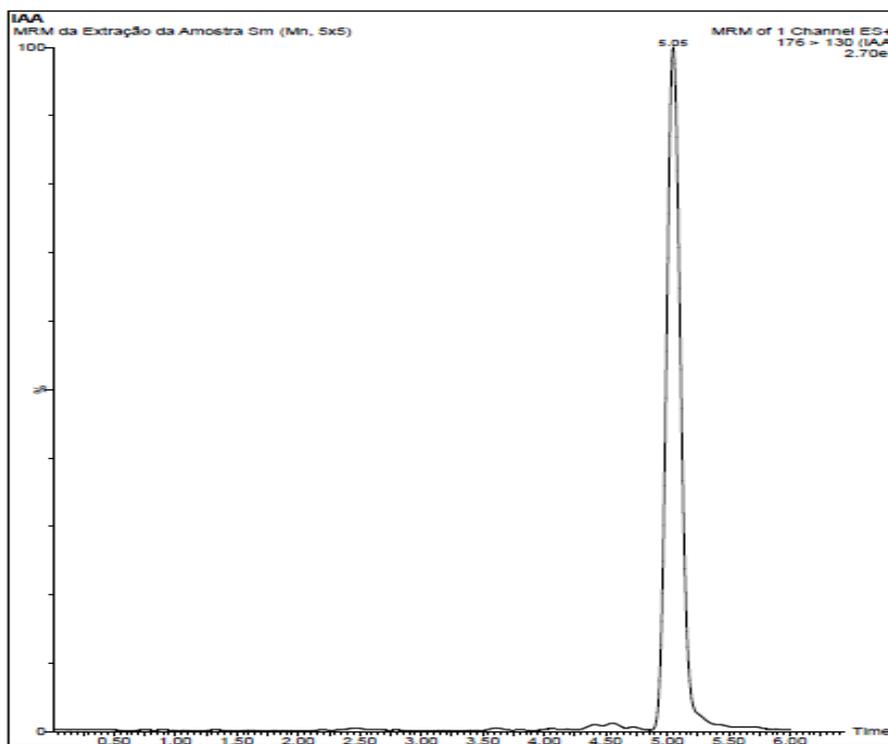


Figura 6 - Espectro de fragmentação da amostra obtido através da colisão com o gás argônio.



Para fins quantitativos foi utilizado o modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizando o íon fragmento m/z 130 proveniente do íon precursor 176, conforme espectro apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Espectro da amostra no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM).



Conforme apresentado na Figura 8 o padrão na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ou 1 ppm apresentou um sinal/ruído em torno de 6076, enquanto que a média da triplicata da amostra apresentou um sinal/ruído de 203 (FIGURA 9). Desta forma, o limite de quantificação do método (LQM) foi de 1,6 PPB (parte por bilhão), demonstrando assim que o método alcançou valores adequados para quantificação do IAA na zona cambial a partir de pequenas amostras da zona cambial.

Figura 8 - Sinal/ruído do espectro do Padrão de IAA no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

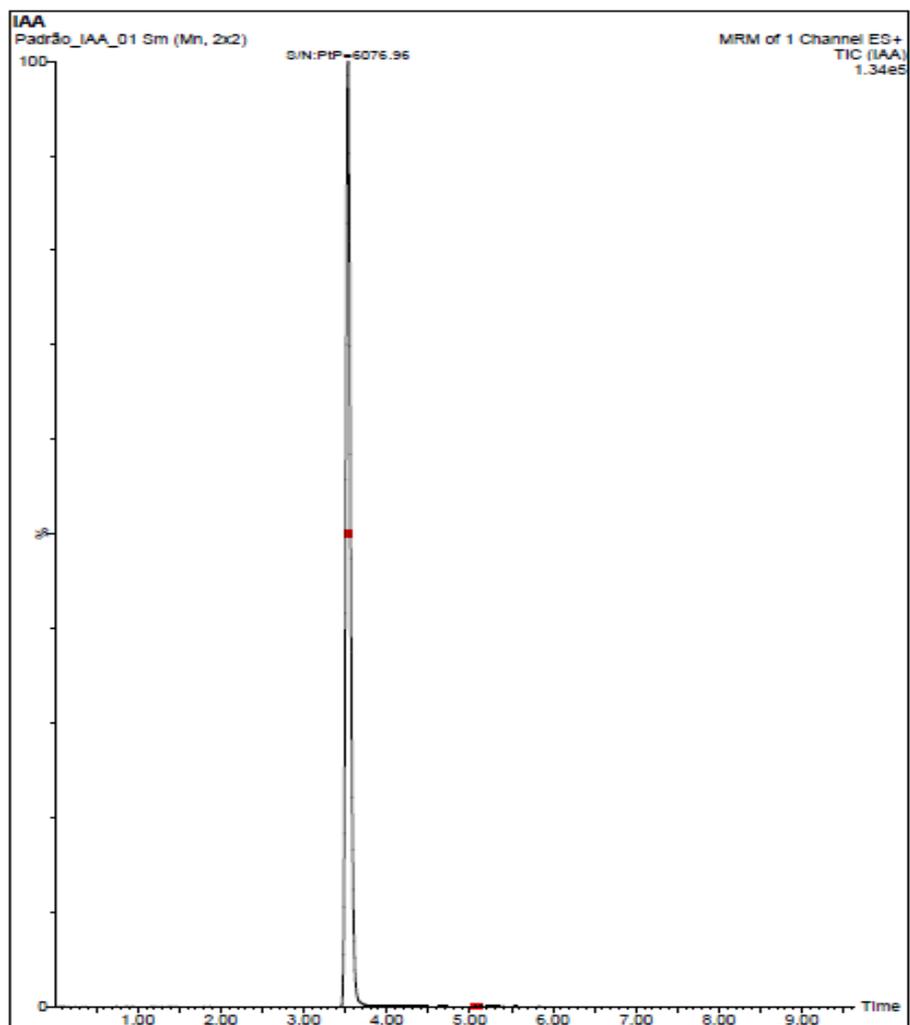
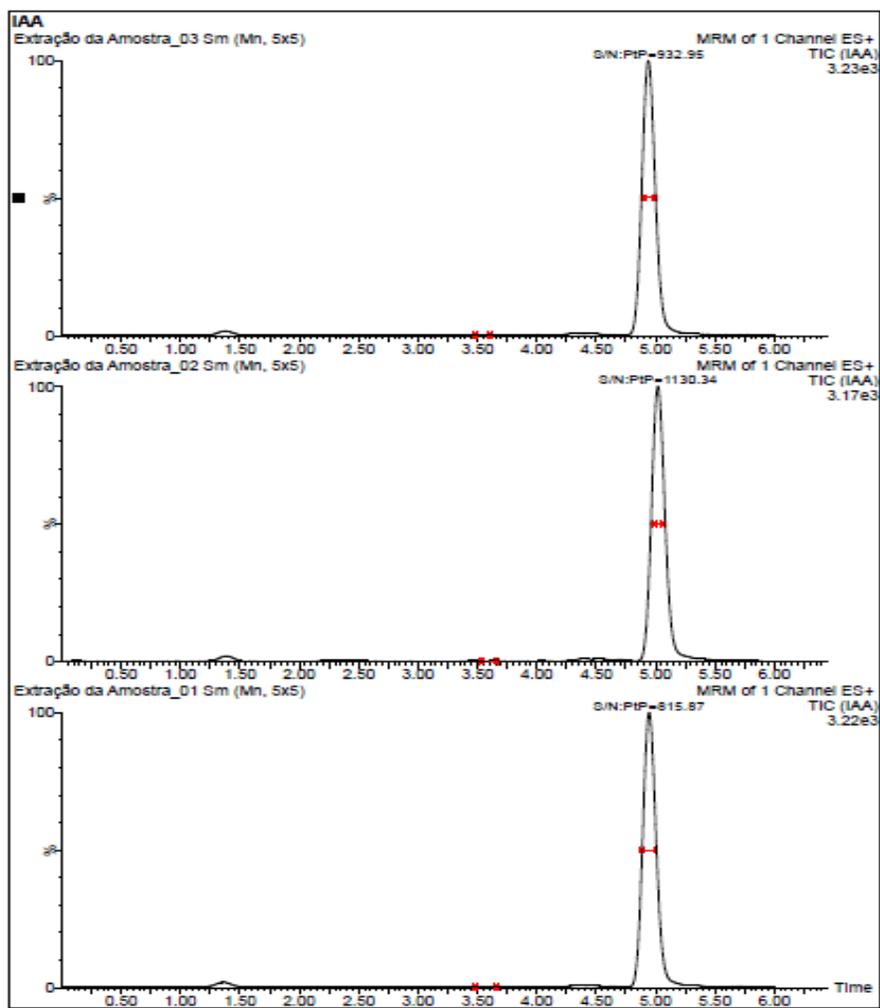


Figura 9 - Sinal/ruído do espectro da amostra de IAA no modo de aquisição de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

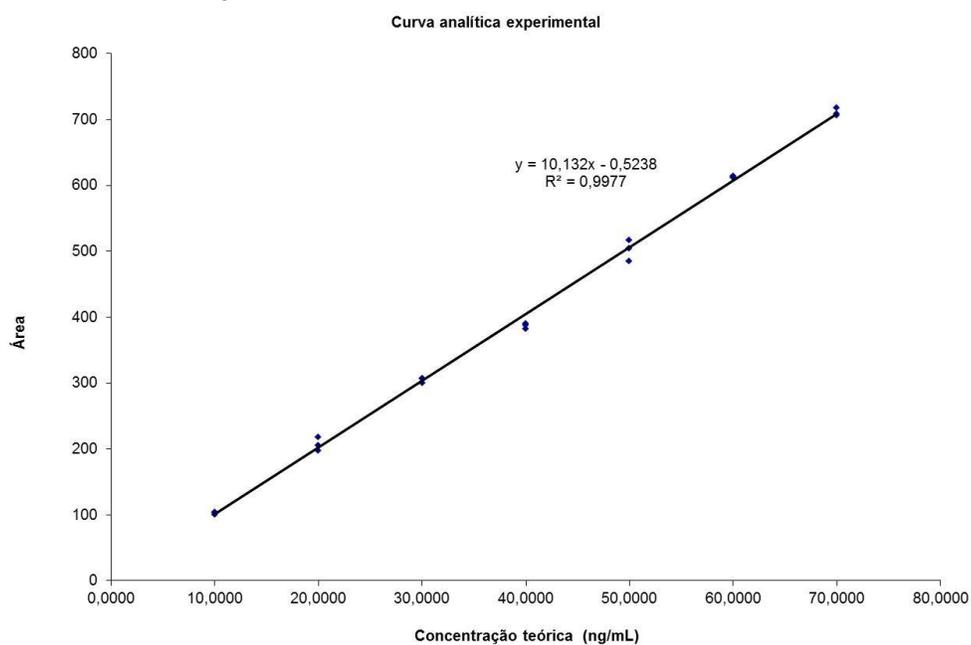


Os resultados obtidos para a curva de linearidade são apresentados na Tabela 3 e Figura 10.

Tabela 3 - Resultado obtido para curva de Linearidade.

Concentração Teórica(ng/mL)	Área	Concentração Obtida (ng/mL)
9,9900	104	10,3167
	101	10,0206
	104	10,3167
Média	103	10,2180
CV(%)	1,68	1,67
19,9800	206	20,3842
	218	21,5686
	198	19,5946
Média	207	20,5158
CV(%)	4,86	4,84
29,9700	308	30,4518
	307	30,3531
	301	29,7608
Média	305	30,1886
CV(%)	1,24	1,24
39,9600	383	37,8544
	391	38,6440
	389	38,4466
Média	388	38,3150
CV(%)	1,07	1,07
49,9500	517	51,0804
	505	49,8959
	485	47,9219
Média	502	49,6327
CV(%)	3,22	3,21
59,9400	614	60,6544
	612	60,4570
	614	60,6544
Média	613	60,5886
CV(%)	0,19	0,19
69,9300	707	69,8336
	709	70,0311
	718	70,9194
Média	711	70,2614
CV(%)	0,82	0,82

Figura 10 - Curva analítica (linearidade) do IAA.



Pela figura curva observa-se coeficiente de determinação de 0.9977 indicando assim alta linearidade do método.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a repetibilidade. Os valores de desvio padrão indicam repetibilidade adequada para o método.

Tabela 4 - Resultado obtido da repetibilidade.

Padrão (40 ng/mL)	
Injeções	Área
1	410
2	427
3	396
4	424
5	415
6	435
Média	418
Desvio Padrão	13,8768
CV	3,32

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a precisão intermediária. Os valores de desvio padrão indicam repetibilidade adequada para o método.

Tabela 5 - Resultado obtido da precisão intermediária.

Padrão (40 ng/mL)	
Injeções	Área
1	410
2	427
3	396
4	424
5	415
6	435
7	437
8	436
9	420
10	433
11	430
12	426
Média	424
Desvio Padrão	12,2137
CV	2,88

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos podemos verificar que o método descrito nesse capítulo é adequado para quantificação do ácido indol-3 acético na zona cambial. A Tabela 6 apresenta o resumo dos resultados da validação do método. Melhorias relativas ao método de extração devem ser consideradas para alcançarmos quantificações em amostras com massas ainda menores.

É ainda importante ressaltar a necessidade de desenvolvimento de métodos simultâneos de quantificação hormonal, incluindo, por exemplo, a quantificação da giberelina e ácido absícico juntamente ao IAA. Esses métodos permitiram testar uma série de hipóteses relativas às interações entre esses hormônios e o processo de xilogênese.

Tabela 6 - Resumo dos resultados da validação do método.

Parâmetros	Crítérios de aceitação	Conclusão
Seletividade/Especificid	Relação m/z coincidiu com a estrutura	Aprovado
Limite de Detecção	Relação sinal/ruído da linha de base $\geq 3,0$	Aprovado
Limite de Quantificação	Relação sinal/ruído da linha de base ≥ 10 .	Aprovado
Linearidade	Coefficiente de correlação (R) $\geq 0,98$.	Aprovado
Precisão	Repetibilidade DP $\leq 15,0$ %.	Aprovado

REFERÊNCIAS

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography: mass spectrometry: an introduction.** New York: J. Wiley, 2003. 276 p.

CALDAS, S. S. et al. Pesticide residue determination in groundwater using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detector and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 642-650, 2010.

CROZIER, A. et al. Analysis of picogram quantities of indole-3-acetic acid by high-performancenliquid chromatography fluorescence procedures. **Planta**, Berlin, v. 150, p. 366-370, 1980.

DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology.** 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 1-12.

EDLUND, A. et al. A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of Indole-3-acetic acid in plant tissues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, p. 1043-1047, 1995.

KUSTER, M.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 25, p. 900-916, 2006.

LITTLE, C. H. A.; PHARIS, R. P. Hormonal control of radial and longitudinal growth in the tree stem. In: GARTNER, B. L. (Ed.). **Plant stems: physiology and functional morphology.** San Diego: Academic, 1995. p. 281-319.

MA, Z. et al. Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera*L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 61, p. 274-2810, 2008.

MALDINEY, R. et al. A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatinriboside. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 90, p.151-158, 1986.

ROBERTS, L. W.; GAHAN, B. P.; ALONI, R. **Vascular differentiation and plant growth regulators.** Berlin: Springer-Verlag, 1988. 154 p.

UGGLA, C. et al. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 9282-9286, 1996.

UGGLA, C.; MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 117, p. 113-121, 1998.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source: another variation on the free-jet theme. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 20, p. 4451-4459, Sept. 1984.