**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho
hidratadas e sob condições de estresse hídrico**

Gabriel Silva Daneluzzi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2012**

Gabriel Silva Daneluzzi
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob
condições de estresse hídrico**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO FERRAZ DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Daneluzzi, Gabriel Silva

Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob condições de estresse hídrico / Gabriel Silva Daneluzzi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Balanço hídrico 2. Cromatografia gasosa 3. Estômatos 4. Milho 5. Neurofisiologia vegetal 6. Neurotransmissores I. Título

CDD 633.15
D179a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A meus pais Benedito e Fátima,
e minha irmã Natália,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos e me fazer forte nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Benedito, minha mãe Fátima por serem pessoas maravilhosas, me ajudarem com tudo, terem sempre uma palavra certa na hora certa, que nunca me deixam desanimar e minha irmã Natália pelo apoio e amizade.

Ao restante da minha família, tios(as), primos(as), avós pelo apoio, torcida, muitas orações e ao pessoal de São Carlos que me acolheu por uns dias durante minhas análises no IQSC/USP.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por fornecer condições de ensino e pesquisa que me possibilitaram crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira pelos muitos ensinamentos científicos e não científicos, confiança, por não medir esforços para dar condições de trabalho a seus orientandos, e por me mostrar o prazer de ensinar.

À Profa. Dra. Helaine Carrer pelas instalações do CEBTEC e à MSc. Valentina Fátima De Martin pela ajuda quando preciso.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e Dra. Mônica Labate por cederem as instalações do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, onde foram feitas as extrações.

À Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende pela utilização do Laboratório de Química Ambiental da USP/São Carlos, e à Dra. Maria Diva Landgraf, do mesmo laboratório pelo auxílio na operação do cromatógrafo, todo o tempo dedicado e paciência com um leigo em cromatografia e Marcelo del Grande da SINC, por colocar em funcionamento o pirolisador acoplado ao GC-MS.

Ao CNPQ e à FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos coordenadores do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres e prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge, pela confiança em mim depositada e demais professores, Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória e Dr. Daniel Scherer de Moura pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse, Francynês Macedo, Rogério Lorençoni, Paula Caroline Moura, Karla Vilaça, Adílson Silva, Marina Gentil, Simone Corrêa, Marcela Müller, Karina Lima, Neidiquele Silveira e Lucas Riboldi pela agradável convivência, ensinamentos, discussões científicas, muitas risadas, discussões estatísticas, leituras dos rascunhos da dissertação e valiosos comentários, incentivo e aos ex-companheiros de laboratório, mas não ex-amigos Cecílio Frois e Saulo Aidar.

Aos colegas de pós-graduação Giovani Rossi, George Lambais, João Marcelo Silva, João Paulo Marques, Danielle Izilda, Tuane Santos e Leonardo Cirilo.

Aos amigos de Osvaldo Cruz pela força de sempre, sobretudo a Galera da Fonte

Ao Otavio Campoe e Cristiane Zani, do departamento de Ciências Florestais pelo empréstimo do LI6400XT e ao prof. Dr. Hilton Thadeu do mesmo departamento pelo conselho estatístico para montagem do experimento.

À secretária do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva pela competência, eficiência e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos funcionários Eliana Nascimento, Eliane Lima, José Francisco Rodrigues, Franciso Vitti e Romeu Rocha.

Ao Diego Noleto pelas dicas estatísticas e Izabela Oliveira pelo auxílio nas análises estatísticas, sempre paciente e atenciosa.

Por fim agradeço minha namorada Simone Missae Tanaka, grande companheira, pela indispensável e grandiosa ajuda, nas análises e extrações, pelas palavras nos momentos de desânimo, e a família Tanaka pelo incentivo e disponibilidade em ajudar mesmo estando longe.

*"O campo da derrota não está povoado de fracassos, mas de
homens que tombaram antes de vencer."*

Abraham Lincoln

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Neurotransmissores	19
2.2 Neurotransmissores em plantas	19
2.3 Acetilcolina.....	21
2.3.1 Acetilcolina não neuronal	21
2.3.2 Ocorrência de acetilcolina em plantas	22
2.3.3 Metabolismo da acetilcolina	23
2.3.4 Receptores de acetilcolina	24
2.3.5 O papel da acetilcolina em plantas	25
2.4 Sinalização a longa distância.....	28
2.5 O sistema colinérgico em estômatos	28
2.6 Estresse hídrico.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material vegetal	31
3.2 Condições de crescimento	31
3.3 Análises fisiológicas	32
3.3.1 Fotossíntese, condutância estomática e transpiração.....	32
3.3.2 Potencial hídrico	32
3.4 Ensaio para isolamento e purificação de acetilcolina.....	33
3.5 Pirólise (Pi), cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massas (MS).....	33
3.6 Delineamento experimental	35
3.7 Análises estatísticas	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Análises fisiológicas	37
4.2 Análises cromatográficas.....	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	61

RESUMO

Uma abordagem neurofisiológica da acetilcolina em plantas de milho hidratadas e sob condições de estresse hídrico

A ocorrência de potenciais de ação e neurotransmissores, componentes principais do sistema nervoso animal, em plantas, bactérias e fungos mostra a universalidade dos princípios de sinalização e transmissão de informações na forma de sinais químicos e elétricos em todos os organismos. Esses tópicos de estudo, juntamente com inteligência em plantas e transporte vesicular de auxina, constituem as linhas de pesquisa principais da recém-criada Neurobiologia Vegetal. Entre os neurotransmissores encontrados em plantas, a acetilcolina atua, entre outras situações, no crescimento e desenvolvimento controlado pelo fitocromo e na permeabilidade iônica de membranas. Nesse contexto, foi sugerido que a acetilcolina pode desempenhar um papel importante na regulação do movimento estomático, tendo efeito estimulatório na abertura dos estômatos além de poder atuar na sinalização entre raiz e parte aérea. Dessa forma, foi proposto identificar a presença deste neurotransmissor em plantas de milho hidratadas e submetidas a estresse hídrico, com o objetivo de correlacionar a presença de acetilcolina com as respostas estomáticas de tais plantas. Além disso, foi objetivo do trabalho avaliar parâmetros fisiológicos como potencial hídrico, condutância estomática, transpiração e fotossíntese líquida e suas possíveis relações com a acetilcolina em três folhas das plantas hidratadas e estressadas. Para tanto, foi montado um experimento em blocos casualizados em esquema fatorial (2x3). Os fatores foram: água, nos níveis de hidratação e estresse, e idade das folhas nos níveis folha 4 (mais velha), folha 5 (idade intermediária) e folha 7 (mais jovem). As plantas foram divididas em 20 blocos, contendo uma planta hidratada e uma sob estresse cada e as análises fisiológicas feitas nas três folhas. As plantas foram colocadas em câmara de crescimento tipo BOD com controle de iluminação e temperatura. Após análises fisiológicas, as folhas foram utilizadas para extração e determinação de acetilcolina. Os extratos purificados e secos foram submetidos à pirólise e cromatografia gasosa e as substâncias identificadas por espectrometria de massas. Não foi detectada acetilcolina nas plantas, apesar de estudos anteriores demonstrarem sua ocorrência em folhas e sementes de milho. Hipóteses foram levantadas para explicar tal fato. Quanto as variáveis fisiológicas, o déficit hídrico reduziu em aproximadamente 59% a transpiração, em 65% a condutância estomática e em 59% a fotossíntese das plantas. Condutância estomática e transpiração, condutância e fotossíntese, e transpiração e fotossíntese apresentaram intensa correlação. Já o potencial hídrico teve baixa correlação com essas variáveis. Quanto ao fator idade, folhas 7 apresentaram maiores valores de fotossíntese, condutância e transpiração que as folhas 4 e 5.

Palavras-chave: Neurotransmissores; Neurobiologia Vegetal; Estômatos; Cromatografia gasosa

ABSTRACT

A neurophysiological approach to acetylcholine in maize plants hydrated and under water stress conditions

The occurrence of action potential and neurotransmitters, the major components of animal nervous system, in plants, bacteria and fungi, shows the universality of signaling principles and information transmission in the way of chemical and electrical signals in all organisms. These study topics, along with plant intelligence and vesicular-based auxin transport, constitute the major research lines of the newly created Plant Neurobiology. Among the neurotransmitters found in plants, the acetylcholine plays a role in phytochrome-controlled growth and development and in membrane ion permeability. In this context, it was suggested that acetylcholine can play an important role in the regulation of stomatal movements, having stimulatory effect in the stomatal opening. In addition it can play a role in root-to-shoot signaling process. Therefore, it was proposed to identify the presence of this neurotransmitter in maize plants hydrated and under water stress, with the aim of correlating the presence of acetylcholine with the stomatal responses of such plants. Moreover, another aim of the study was to evaluate physiological parameters like water potential, stomatal conductance, transpiration rate and net photosynthetic rate and their possible relationship with the acetylcholine in three leaves of hydrated and stressed plants. Therefore, an experiment was set up in randomized block design in 2x3 factorial. The factors were: water, in the levels of hydration and stress, and leaves age in the levels leaf 4 (older), leaf 5 (intermediary age) and leaf 7 (younger). The plants were divided in 20 blocks, and each one has had one hydrated plant and one stressed plant and the physiological analysis was made in three leaves. The plants were placed in B.O.D. growth chamber under controlled conditions of light and temperature. After the physiological analysis, the leaves were used to extraction and determination of acetylcholine. The dried and purified extracts were subjected to pyrolysis and gas chromatography and the substances identified by mass spectrometry. The acetylcholine was not detected in plants, although earlier studies have had demonstrated its occurrence in maize leaves and seeds. Hypotheses were elaborated to explain such fact. Regarding the physiological variables, water stress reduced the plants transpiration rate in 59%, stomatal conductance in 65% and net photosynthesis in 59%. Stomatal conductance, transpiration and photosynthesis were strongly related. On the other hand, the water potential showed weak correlation with that variable. As for the age factor, leaves 7 had higher photosynthetic rates, conductance and transpiration than the leaves 4 and 5.

Keywords: Neurotransmitters; Plant Neurobiology; Stomata; Gas-chromatography

1 INTRODUÇÃO

A transmissão de sinais entre células é essencial para a vida de um organismo à medida que ela fornece mecanismos pelos quais células percebem, interpretam e respondem a estímulos externos (MURCH, 2006).

As plantas têm que monitorar constantemente vários parâmetros do ambiente, tais como luz, gravidade, conteúdo de água do solo, predadores, além de muitos outros, transmitindo rapidamente essas informações para células adjacentes ou ao longo do eixo apical-basal, ou seja, o comportamento que exibem é coordenado por todo o organismo através de mecanismos de sinalização integrada, comunicação e sistemas de resposta.

Dessa maneira, além de sinais elétricos, produzem uma ampla faixa de fitoquímicos que medeiam a função celular e traduzem estímulos ambientais para sua sobrevivência, sendo que muitos deles são moléculas do sistema nervoso humano (BRENNER et al., 2006; MURCH, 2006)

A presença de potenciais de ação e de neurotransmissores clássicos de sinapses em plantas, bactérias, algas, protozoários, esponjas e fungos (HORIUCHI et al., 2003; KAWASHIMA et al., 2007; WESSLER et al., 2001) e suas significativas atividades fisiológicas mostram a universalidade dos princípios de sinalização e transmissão de informações na forma de sinais químicos e elétricos em todos os organismos vivos (BRENNER et al., 2006; ROSHCHINA, 2001).

Os neurotransmissores já encontrados em plantas incluem acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA e glutamato (ROSHCHINA, 2001).

Nesse contexto surgem algumas perguntas: o que faz em plantas moléculas tradicionalmente reconhecidas como neurotransmissores em animais, já que plantas não possuem tipos celulares como neurônios? Tais substâncias estariam atuando também como sinalizadores?

Neurotransmissores têm muitas funções em plantas, as quais diferem das conhecidas funções sinápticas em animais, sendo elas: sinalização química, acionamento da germinação de sementes e pólenes, morfogênese, regulação da permeabilidade iônica, balanço energético, metabolismo, movimentos (de raízes, folhas e estômatos), proteção contra fatores de estresse, regulação de eventos elétricos, entre outros (ROSHCHINA, 2001; TRETYN; KENDRICK, 1991).

É importante salientar que esse tipo de pesquisa não é recente, porém é pouco difundida, não tendo espaço na Fisiologia Vegetal clássica. Nesse contexto surgiu a Neurobiologia Vegetal com o propósito de entender como as plantas percebem seu ambiente e

respondem a estímulos externos de maneira integrada, levando em conta componentes moleculares, químicos e elétricos da sinalização intercelular (BRENNER et al., 2006). As principais pesquisas desse novo campo da Biologia Vegetal são com relação à sinalização elétrica a longas distâncias, neurotransmissores e inteligência em plantas.

Entre os neurotransmissores, a acetilcolina (ACh) foi identificada em 65 espécies de plantas, entre elas algumas de importância agrônômica como feijão (HARTMANN; KILBINGER, 1974b), milho (MIURA; SHIH, 1984; ROSHCHINA, 1991) e trigo (TRETYN; ŚLESIAK; ANDERSZ, 1985), tendo papel em eventos fisiológicos como crescimento e desenvolvimento controlado pelo fitocromo, porém seu efeito mais pronunciado é na alteração da permeabilidade da membrana a íons (ROSHCHINA, 2001).

Além da ACh, suas enzimas de síntese e degradação têm sido amplamente reconhecidas no reino vegetal (EVANS, 1972; FLUCK; JAFFE, 1974a,b; HARTMANN; KILBINGER, 1974b; LEES; LAHUE; THOMPSON, 1978; MOMONOKI; MOMONOKI, 1991, SAGANE et al., 2005; VERBEEK; VENDRIG, 1977) bem como sítios de ligação da ACh, que corresponderiam aos receptores nicotínicos e muscarínicos, identificados em membranas de células-guarda (MENG et al., 2001).

Nesse contexto, foi sugerido que a ACh pode desempenhar um papel importante na regulação do movimento estomático, tendo efeito estimulatório na abertura dos estômatos (WANG; WANG; LOU, 1999) além de poder atuar na sinalização entre raiz e parte aérea (WANG et al., 2003).

Tendo em vista a participação da ACh na regulação de um processo fisiológico de extrema importância para as plantas, além da integração dos variados sinais que chegam aos estômatos não estar bem estabelecida, este trabalho foi desenvolvido para estudar o papel da ACh nas respostas estomática de plantas de milho.

O milho foi escolhido devido a sua importância econômica, caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia como as indústrias farmacêuticas, de pneus, papéis, adesivos, filmes e embalagens biodegradáveis (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

Dessa forma, foi proposto identificar a presença de ACh em plantas de milho hidratadas e submetidas a estresse hídrico, com o objetivo de correlacionar a presença do biomediador com as respostas estomáticas das plantas em tais condições.

As hipóteses deste trabalho foram:

- Existe forte correlação entre o conteúdo de ACh nas folhas e a transpiração e entre este e a condutância estomática de plantas de milho em condições de hidratação ótima;

- Folhas de plantas hidratadas apresentam maior conteúdo de ACh que folhas de plantas sob estresse hídrico;
- Plantas de milho sob estresse hídrico apresentam reduções significativas na fotossíntese, condutância estomática e transpiração;
- Folhas jovens apresentam taxas de fotossíntese, condutância estomática e transpiração maiores que folhas maduras.

A presença de um sistema colinérgico em plantas sugere um importante papel para a acetilcolina em organismos desprovidos de sistema nervoso. O conhecimento obtido com o estudo de neurotransmissores em plantas é de relevância farmacológica e agrônômica além de abrir novas perspectivas dentro da Fisiologia Vegetal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neurotransmissores

Para sinalização, o sistema nervoso de animais superiores utiliza-se de células especializadas (neurônios) com contatos denominados sinapses e moléculas neurotransmissoras. Tais compostos estão divididos em duas classes: (1) pequenas moléculas transmissoras e (2) peptídeos neuroativos. As pequenas moléculas transmissoras incluem (a) acetilcolina (ACh), (b) quatro aminoácidos que incluem, glutamato, aspartato, glicina e GABA (ácido γ -aminobutírico), e (c) quatro monoaminas compreendendo as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), e a indolamina serotonina. Os peptídeos neuroativos incluem pelo menos cinquenta diferentes peptídeos farmacologicamente ativos tais como somatostatina, vasopressina, encefalinas etc (NOBACK et al., 2005).

Para um agente químico ser chamado de neurotransmissor, ele deve ser sintetizado no neurônio pré-sináptico, ser estocado em vesículas e liberado na fenda sináptica após a ocorrência de um potencial de ação, ligar-se a um receptor na membrana pós-sináptica de outro neurônio ou efetor (fibra muscular ou célula glandular) onde regula canais iônicos e altera o potencial de membrana. Finalmente, ele deve ser removido da fenda sináptica por recaptação no neurônio pré-sináptico ou por degradação bioquímica (NOBACK et al., 2005).

Algumas substâncias liberadas em sinapses modificam ou modulam a atividade neuronal ao invés de iniciá-la, sendo chamadas de neuromoduladores. Elas atuam no neurônio pós-sináptico interagindo com receptores ligados a proteínas G e um sistema de mensageiros secundários. A proteína receptora a qual o transmissor se liga determina se ele agirá como um neurotransmissor ou como um neuromodulador. Além disso, a maioria dos mensageiros primários pode agir tanto como transmissores quanto como moduladores. Dessa maneira, no uso comum, o termo neurotransmissor frequentemente se aplica para transmissores e para moduladores (NOBACK et al., 2005).

2.2 Neurotransmissores em plantas

A sinalização celular e intracelular nos vegetais ocorre através de sinais rápidos ou lentos, derivados de fontes químicas, hidráulicas e elétricas. As plantas podem propagar dois tipos principais de sinais elétricos: potenciais de ação (PA) e os potenciais de variação (PV) (BRENNER et al., 2006; DAVIES, 1987, 2004). Os potenciais de ação foram descobertos em plantas em 1873 (BURDON-SANDERSON, 1873) e naquele tempo o cérebro era território ainda inexplorado e a base celular dos circuitos neuronais não era aceita. Hoje, entende-se em detalhes a condução do impulso nervoso via potencial de ação em animais.

Além dos potenciais de ação, uma das evidências mais curiosas da existência de atividades celulares comparáveis àquelas de células nervosas, é a presença de moléculas neuromodulatórias e neurotransmissoras em células vegetais (ROSHCHINA, 2001). Até agora, foram encontrados os seguintes neurotransmissores em plantas: acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina, GABA e glutamato (ROSHCHINA, 2001).

O papel das catecolaminas em mamíferos é bem estudado, porém pouco é conhecido com relação ao seu significado fisiológico em plantas (ŚWIĘDRYCH et al., 2004). Estudos mostram que as catecolaminas promovem o florescimento em plantas de dia-curto (KHURANA et al., 1987) e acumulam em plantas sob estresse (ŚWIĘDRYCH et al., 2004).

O GABA também se acumula em condições de estresse e está envolvido na regulação do pH, armazenamento de nitrogênio, desenvolvimento vegetal e defesa contra insetos (SHELP; BOWN; McLEAN, 1999; SHELP; Van CAUWENBERGHE; BOWN, 2003). Foi demonstrado também que o GABA ajuda o tubo polínico em crescimento a navegar em direção ao óvulo, agindo como uma molécula sinalizadora (PALANIVELU et al., 2003).

O glutamato, além de ser um aminoácido, também tem se mostrado como molécula sinalizadora em plantas, particularmente com a descoberta de seu receptor (LAM et al., 1998) que têm todas as características dos seus respectivos em animais (TAPKEN; HOLLMANN, 2008). Nos animais, ele é um dos mais compreendidos e o mais ocorrente neurotransmissor excitatório em sinapses cerebrais. Já em plantas, atuando como sinalizador, foi demonstrado causando rápida despolarização da membrana em raízes de *Arabidopsis* (DENNISON; SPALDING, 2000), agindo sinergicamente com a glicina para controlar abertura de canais de cálcio (DUBOS et al., 2003).

Tudo isso sugere que o glutamato atua na comunicação célula-célula como um neurotransmissor em plantas com efeitos no desenvolvimento celular, crescimento radicular, morfogênese e comportamento (FORDE; LEA, 2007; LI et al., 2006; WALCH-LIU et al., 2006).

Tal como os neurotransmissores, um neurohormônio em mamíferos, a melatonina, tem sua presença relatada em plantas superiores (POSMYK; JANAS, 2009). O trabalho de Hernández-Ruiz, Cano e Arnao (2004) confirmou que a melatonina é um regulador de crescimento e desenvolvimento em plantas com mecanismo de ação similar ao das auxinas, no entanto esse mecanismo não é claramente explicado. Melatonina também foi detectada desempenhando papel em uma variedade de processos complexos como o florescimento (KOLAR; MACHACKOVA, 2005).

Muitos dos neurotransmissores são derivados de, e são também estruturalmente similares a aminoácidos. Portanto, não é surpreendente que os transportadores de aminoácidos e neurotransmissores sejam altamente conservados entre animais e vegetais (WIPF et al., 2002). Vários derivados do triptofano foram investigados quanto a seu papel na sinalização em plantas, incluindo a melatonina e a serotonina (ROSHCHINA, 2001).

Interessantemente a esse respeito, o mais importante sinalizador derivado do triptofano em plantas é a auxina, que tem um papel regulatório básico no crescimento e desenvolvimento vegetal. Auxina, que é transportada de célula a célula, tem também algumas características remanescentes de neurotransmissores (BALUŠKA; ŠAMAJ; MENZEL, 2003; BALUŠKA; VOLKMANN; MENZEL, 2005).

2.3 Acetilcolina

Do ponto de vista químico, a ACh [$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$], uma amina quaternária, é um éster de ácido acético e colina (KURCHII, 2009; TRETYN; KENDRICK, 1991).

A ACh em animais serve para propagar um estímulo elétrico através da junção sináptica. Na extremidade do neurônio pré-sináptico, um impulso elétrico desencadeia a liberação de acetilcolina, até então acumulada em vesículas, na fenda sináptica via exocitose. A ACh então se liga a seu receptor na membrana pós-sináptica e esta ligação induz impulsos subsequentes para o neurônio pós-sináptico. Finalmente a ACh, que é liberada novamente pelo receptor na fenda sináptica, é rapidamente degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (DUNANT; BABEL-GUERIN; DROZ, 1980; KELLY et al., 1979; MacINTOSH, 1981). Colina é então transportada de volta a célula pré-sináptica para nova produção de ACh. No sistema nervoso periférico, a ACh é o principal transmissor de neurônios motores (NOBACK et al, 2005).

2.3.1 Acetilcolina não neuronal

Embora seja conhecida como um importante neurotransmissor no sistema nervoso central e periférico de vertebrados e insetos, ACh e sua atividade sintetizadora foram detectadas em formas de vida desprovidas de sistema nervoso, uni- e multicelulares, tais como bactérias, algas, protozoários, esponjas, fungos e plantas (HORIUCHI et al., 2003; KAWASHIMA et al., 2007; WESSLER et al., 2001). Além disso, foi detectada também em células não neuronais de mamíferos, incluindo linfócitos (KAWASHIMA; FUJII, 2000, 2003, 2004), células epiteliais gastrointestinais, respiratórias e urogenitais (WESSLER;

KIRKPATRICK; RACKÉ, 1998; WESSLER et al., 2001) e células endoteliais vasculares (KIRKPATRICK et al., 2001).

Essas descobertas sugerem que a ACh tem sido expressa bem antes do surgimento do primeiro sistema nervoso e que, além de seu papel como neurotransmissor, ela serve como mediador local regulando várias funções fisiológicas (GRANDO; KAWASHIMA; WESSLER, 2003; HORIUCHI et al., 2003; WESSLER; KIRKPATRICK; RACKÉ, 1998).

Neste contexto o caráter universal da ocorrência de neurotransmissores e a similaridade das funções a nível celular nos diversos organismos nos fazem repensar a especificidade do termo “neurotransmissor”. Tal designação poderia ser substituída por uma mais ampla tal como “biomediador” para fazê-la aplicável a qualquer célula, não somente a organismos com sistema nervoso (ROSHCHINA, 1991, 2001). O conceito de biomediadores permite-nos imaginar o quadro evolutivo, onde as substâncias neurotransmissoras participaram de diferentes processos celulares, incluindo sistemas não-sinápticos de micro-organismos e plantas.

2.3.2 Ocorrência de acetilcolina em plantas

A acetilcolina foi extraída, isolada e identificada pela primeira vez por Ewins (1914) em preparações do fungo *Claviceps purpurea*. Em plantas ela foi descoberta por Emmelin e Feldberg (1947) em tricomas urticantes e folhas de *Urtica urens*.

Roshchina (2001) cita a acetilcolina como sendo encontrada, no reino vegetal, em 65 espécies de 33 diferentes famílias. Trabalhos posteriores detectaram acetilcolina em outras diferentes espécies das divisões Antophyta, Coniferophyta, Pterophyta, Sphenophyta e Bryophyta (HORIUCHI et al., 2003).

A ACh isolada de tecidos vegetais mostra propriedades idênticas àquelas ocorrendo em células nervosas, sendo encontrada em quantidades variando de nanogramas até microgramas por grama de peso fresco do tecido (HORIUCHI et al., 2003).

O nível de ACh varia dependendo da fase de desenvolvimento da planta e das condições ambientais. Como uma regra, as maiores concentrações do biomediador são encontradas em partes jovens em crescimento (TRETYN; KENDRICK, 1991). Kawashima et al. (2007) detectaram a concentração de $2,9 \mu\text{mol g}^{-1}$ na parte aérea de bambu, a maior já registrada. Acredita-se que folhas jovens são os locais predominantes de síntese de ACh, porém esta foi encontrada em todos os órgãos vegetais e em qualquer estágio do desenvolvimento (semente, plântula ou planta madura) (MIURA; SHIH, 1984).

Entre as plantas de importância agrônômica, a ACh é encontrada em rabanete, pepino (MOMONOKI; MOMONOKI, 1991), abóbora, feijão, ervilha, girassol (HARTMANN; KILBINGER, 1974b), aveia (TRETYN; TRETYN, 1988), trigo (TRETYN; ŚLESÁK; ANDERSZ, 1985), milho (MIURA; SHIH, 1984; ROSCHINA, 1991), batata (MARQUARDT; SCHUMACHER; VOGG, 1952), cenoura, couve (HOLTZ; JANISCH, 1937) e tomate (WIŚNIEWSKA; TRETYN, 1999).

Embora a ACh seja amplamente expressa no reino vegetal, nosso conhecimento sobre a organização e papel biológico do sistema colinérgico em plantas é ainda escasso. Pouco se sabe sobre as enzimas de síntese e degradação, receptores e seus respectivos papéis biológicos. Destacam-se os trabalhos de Tretyn, Łukasiewicz-Rutkowska e Kopcewicz (1997), Wang et al. (1998), Meng et al. (2001), Sagane et al. (2005) e Yamamoto, Sakamoto e Momonoki (2011).

2.3.3 Metabolismo da acetilcolina

Os precursores da acetilcolina em plantas, assim como em animais, são acetil-CoA e colina. A síntese ocorre da seguinte forma: acetil-CoA é sintetizado a partir do acetato pela enzima acetil-CoA-sintetase ou do piruvato pelo complexo da piruvato desidrogenase. Colina é formada de duas formas: a partir do aminoácido serina e de fosfatidilcolina de membranas. Por fim, a enzima colina acetiltransferase catalisa a reação de colina com acetil-CoA. A hidrólise da acetilcolina a seus respectivos derivados metabólicos, colina e acetato, é feita pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (BLUSZTAJN et al., 1987).

Figura 1- Síntese e degradação da acetilcolina

A primeira evidência direta de genes e proteínas relacionados ao sistema mediado por ACh em plantas foi demonstrada no estudo de Sagane et al. (2005) onde a proteína AChE foi purificada de plântulas de milho estioladas, e o cDNA codificando tal enzima foi caracterizado e comparado com aquele da AChE da enguia elétrica para efeito de comparação com a enzima animal. A sequência deduzida de aminoácidos desta enzima não exibiu similaridade aparente com aquela da enzima animal, embora a região catalítica fosse a mesma, ou seja, tratava-se de uma colinesterase verdadeira. Foram feitas também triagens *in silico* que indicaram que homólogos da AChE de milho estão amplamente distribuídos em plantas, mas não em animais. Tais descobertas levaram os autores a propor que a família da AChE encontrada no trabalho compreende uma nova família de enzimas que é especificamente distribuída no reino vegetal. Trabalhos posteriores também caracterizaram a AChE de *Macroptilium atropurpureum* Urb. (YAMAMOTO; OGURI; MOMONOKI, 2008) e *Salicornia europaea* L. (YAMAMOTO et al., 2009).

Recentemente, Yamamoto, Sakamoto e Momonoki (2011) demonstraram duas isoformas da AChE de milho e mudanças nas suas atividades *in vitro* e *in situ* em resposta ao estresse por calor. Os autores mostraram também que a super-expressão da AChE de milho em plantas de tabaco transgênicas aumentou sua tolerância ao calor, sugerindo que essa enzima desempenha um papel positivo na tolerância a altas temperaturas em milho.

Quanto a localização da AChE, Yamamoto, Sakamoto e Momonoki (2011) demonstraram tal enzima na região nodal de coleótilos e em sementes de milho e na matriz da parede celular de folhas de arroz transgênico super-expressando genes da AChE de milho. Também em milho, a enzima foi detectada nos espaços extracelulares em folhas e caules. Assim, acetilcolinesterases vegetais podem funcionar nos espaços extracelulares, similarmente as isoformas de AChE animais (ROTUNDO, 2003; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

Nesse contexto, a proposição de Sagane et al. (2005) é que o sistema mediado por ACh esteja localizado na região extracelular ao redor de canais plasmodésmicos que poderia conduzir o tráfego célula a célula pela regulação da abertura e fechamento de canais, controlando seletivamente o tráfego por tais estruturas.

2.3.4 Receptores de acetilcolina

Os receptores são os locais primários de percepção de sinais externos pelas células, controlando a comunicação entre elas e o ambiente. Em animais, há dois tipos de receptores de ACh, os receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR). O receptor nicotínico, um canal iônico, pode ser estimulado e inibido, respectivamente, pelos alcalóides nicotina e d-

tubocurarina, enquanto que o receptor muscarínico, acoplado a proteína G, pode ser estimulado pela muscarina e inibido por atropina, também alcalóides. Em neurônios, a ACh se liga a seu receptor estimulando a atividade de canais iônicos. Em células não-neuronais a ACh pode alterar a permeabilidade de membranas a íons, levando a ativação de enzimas envolvidas na produção ou ativação de mensageiros secundários via proteína G (WESSLER; KIRKPATRICK; RACKÉ, 1999).

Já em plantas, embora o(s) gene(s) que codifique(m) os receptores de ACh (AChR) não tenha(m) sido identificado(s), os chamados “sítios de ligação da ACh” foram detectados em cloroplastos (ROSHCHINA, 2001), membrana vacuolar (GONG; BISSON, 2002), frações de membranas de *Phaseolus aureus* L. (FLUCK; JAFFE, 1974a) e *Phaseolus vulgaris* L. (HARTMANN; GUPTA, 1989) e membrana plasmática de células guarda de *Vicia faba* L. e *Pisum sativum* L. (MENG et al., 2001). Nos estômatos, tais sítios de ligação corresponderiam aos receptores muscarínicos e nicotínicos, como mostram os trabalhos de Wang et al. (1998, 2000) e Meng et al. (2001), em *Vicia faba* L., com agonistas e antagonistas dos receptores.

2.3.5 O papel da acetilcolina em plantas

Várias investigações apontaram a participação da ACh na regulação de processos fisiológicos em plantas, especialmente no crescimento e desenvolvimento controlado pelo fitocromo. Foi encontrado que a ACh pode imitar o efeito da luz vermelha na regulação de alguns fenômenos fotomorfogenéticos (HARTMANN; GUPTA, 1989; JAFFE, 1970; TRETYN; KENDRICK, 1991). Wiśniewska e Tretyn (1999) demonstraram que o nível de ACh em plantas de tomate crescidas na luz foi maior que em plântulas crescidas no escuro. Além disso, a irradiação de plântulas selvagens estioladas com luz vermelha provocou um aumento no nível endógeno de ACh, ao passo que um pulso de luz vermelho-distante aplicado diretamente após a luz vermelha reverteu este efeito (WIŚNIEWSKA; TRETYN, 2003).

Também em tomate, Bamel, Gupta e Gupta (2007) demonstraram que a ACh induz enraizamento em explantes foliares cultivados *in vitro*. Sendo o enraizamento (*in vivo* ou *in vitro*) uma clássica resposta a auxina, a eficácia da ACh em promovê-lo, levanta uma interessante possibilidade sobre o mecanismo de ação da ACh e seu envolvimento com a auxina. Precisa-se descobrir se ACh estaria agindo como um hormônio de crescimento ou interagindo com a auxina e outros hormônios.

Com relação ao alongamento celular, foi demonstrado que a ACh juntamente com a auxina aumentam a expressão do gene LeEXPA2 da expansina em hipocótilos de tomate, em comparação aos tratamentos de auxina e ACh separadamente (FORNACIARI; ANCESCHI;

ARRU, 2009). Foi demonstrado também que ela aumentou a taxa de alongamento de segmentos isolados de coleótilos de aveia (EVANS, 1972) e de crescimento de hipocótilos de pepino (VERBEEK; VENDRIG, 1977) e soja (MUKHERJEE, 1980). No entanto, seu efeito no alongamento de *Vigna sesquipedalis* (L.) Fruw. foi diferente, suprimindo o crescimento do hipocótilo e simultaneamente promovendo o do epicótilo (HOSHINO, 1983).

Horiuchi et al. (2003) relataram que a parte aérea de bambu (*Phyllostachys bambusoides*), sobretudo a parte superior, cuja taxa de crescimento é muito rápida, contém significantes níveis de ACh e sua capacidade de síntese.

Em muitos casos, o efeito no crescimento ocorre pela interação com diferentes hormônios, como a auxina (EVANS, 1972), giberelinas (LAWSON et al., 1978; MUKHERJEE, 1980; VERBEEK; VENDRIG, 1977) ou etileno (MUKHERJEE, 1980).

Quanto a germinação, Tretyn, Kopcewicz e Ślesak (1988) não encontraram efeito da ACh, mesmo em altas concentrações, sobre a germinação de trigo e aveia, que apresentam fotoblastismo neutro, em condição de escuro ou luz branca contínua. Na luz a ACh acelerou a taxa de germinação de sementes fotoblásticas positivas de *Rumex obtusifolius* L. e inibiu a germinação de sementes fotoblásticas negativas de *Plantago lanceolata* L. Tretyn, Ślesak e Kwiatkowska (1986) encontraram também que a ACh somente demonstra atividade quando há luz e propuseram que a luz inibe a acetilcolinesterase, que também estava presente nas sementes estudadas.

Esses estudos mostram que os efeitos da ACh na germinação e crescimento de plantas varia de espécie para espécie, sendo necessário mais pesquisas para elucidar seu papel.

Em nível celular, o mecanismo chave pelo qual os neuromediadores agem nas células animais consiste em alterar a permeabilidade de membranas, o potencial de membrana e processos associados. Como são substâncias hidrofílicas, neuromediadores não penetram na membrana plasmática, mas agem do lado de fora dela (McQUEEN, 1987).

Jaffe (1970) foi o primeiro a demonstrar que a ACh é capaz de aumentar a permeabilidade iônica de membranas vegetais e induzir mudanças no potencial de membrana. Ele descobriu que sob ação da ACh ou luz vermelha, íons H^+ saem das células radiculares de *Phaseolus aureus* para o meio externo. Como resultado, surge um potencial bioelétrico positivo na parte externa da membrana. Este resultado foi confirmado por Tanada (1972), que mostrou que extremidades radiculares de plântulas estioladas de *Phaseolus aureus*, sob luz vermelha, aderem à superfície de um vidro negativamente carregada (Efeito de Tanada). Um efeito similar foi induzido pela ACh. É provável que a ACh e a luz vermelha dêem origem a um potencial de membrana mais positivo que o potencial de repouso.

Quanto a permeabilidade ao Ca^{2+} , Tretyn (1987) demonstrou que a ACh, como a luz vermelha, acelera a absorção deste cátion por coleóptilos de *Avena*, o que é acompanhado pela secreção de H^+ . O biomedador também induziu o inchamento dependente de Ca^{2+} de protoplastos do mesofilo foliar de plântulas estioladas de trigo (TRETYN; BOSSEN; KENDRICK, 1990; TRETYN et al., 1990).

Os agonistas da acetilcolina, muscarina e nicotina, também promoveram o inchamento de protoplastos dependente tanto de Ca^{2+} , quanto de K^+/Na^+ , ao passo que seus antagonistas, atropina e d-tubocurarina anularam tais respostas (TRETYN; KENDRICK, 1990, TRETYN et al., 1990).

Pode ser visto no trabalho de Roshchina (2001) que mais frequentemente a ACh induz despolarização da membrana e um aumento da permeabilidade ao K^+ . Os efeitos da ACh exógena foram determinados em folhas de *Macroptilium atropurpureum*, destacadas e submetidas a estresse por calor, para a qual o pulvino primário estava ainda ligado. A aplicação de ACh juntamente com K^+ ou Ca^{2+} notavelmente melhorou a recuperação foliar após processo de murcha. Tais resultados sugerem que ACh pode controlar o fluxo de íons ou hormônios regulando a abertura de canais iônicos nas células motoras de pulvinos (MOMONOKI; MOMONOKI, 1992).

Como a ACh é um transmissor químico em animais servindo para propagar um estímulo elétrico pela junção sináptica (KELLY et al., 1979; MacINTOSH, 1981), Momonoki (1992) propôs um papel similar para a ACh em plantas: o transmissor químico funcionaria na despolarização da junção entre o córtex e o estelo vascular, assim permitindo a liberação de solutos do estelo para os tecidos corticais. AChE hidrolisaria então ACh ao redor do estelo retornando o sistema ao estado fundamental. Assim, os canais plasmodésmicos poderiam ser controlados pela ligação da ACh a seus receptores, assim como no sistema animal. Consequentemente, o transporte de hormônios e substâncias poderia ser regulado pela abertura e/ ou fechamento de canais condutores. À medida que a ACh regula canais iônicos ela participa na homeostase hídrica da planta.

Os efeitos observados são de interesse não somente em vista dos efeitos intra e intercelulares de biomedadores no organismo por si só. Deve ser notado que ACh e serotonina ocorrem amplamente em secreções vegetais (ROSHCHINA; ROSHCHINA, 1993) e como produtos exógenos podem exercer interferência alelopática na comunidade vegetal (ROSHCHINA, 1999). Claramente, este fenômeno tem grande significância ecológica. Além disso, a presença de neurotransmissores em plantas tem implicações agronômicas e farmacológicas.

2.4 Sinalização a longa distância

A capacidade de responder a estímulos é essencial para um organismo sobreviver e prosperar sendo que seu comportamento adaptativo é incorporado de forma que ele seja capaz de tomar decisões antes que ocorram danos graves. Tais respostas são melhores demonstradas em animais cuja sinalização nervosa, que os permite reagir rápida e voluntariamente, é caracterizada por um padrão de sinalização a longa distância, ou seja, quando uma parte é estimulada, outra pode adotar ações correspondentes (JIA; ZHANG, 2008).

Vivendo em um ambiente em constantes mudanças, as plantas também evoluíram a capacidade de perceber e responder a estímulos do ambiente. Nesse contexto, o conhecimento acerca da resposta adaptativa das plantas associadas com sinalização a longa distância é relativamente escasso destacando-se as pesquisas sobre movimentos estomáticos relacionados à sinalização raiz-parte aérea em plantas sob estresse hídrico (JIA; ZHANG, 2008).

Neste caso, ácido abscísico, pH e sinais hidráulicos têm sido demonstrados como sendo os sinais dominantes envolvidos no processo (DAVIES; ZHANG, 1991; REN et al., 2007; WILKINSON, 1999). Por outro lado, o transporte a longas distâncias de citocininas, acetilcolina e outras substâncias biologicamente ativas também tem atuação potencial na função estomática normal sob condições sem estresse (LOU, 1998). No caso de condições de estresse, elas podem agir diretamente como um sinal negativo ou possivelmente como moduladores da sensibilidade estomática, assim desempenhando importantes papéis na resposta dos estômatos aos sinais remotos induzidos por estresse.

Enquanto o papel crucial do ABA na sinalização raiz parte aérea tem sido bem estabelecido, deve ser notado que o mecanismo para a sinalização a longa distância é complicado e o ABA pode não ser um sinal universal desempenhando papel central em todos os casos. Existem evidências de que a regulação remota do movimento estomático pelo ABA derivado da raiz depende da espécie vegetal. Por exemplo, ABA derivado da raiz pode agir como um sinal central para regular sensivelmente o movimento estomático em muitas espécies vegetais (KHALIL; GRACE, 1993; ZHANG; DAVIES, 1989, 1990), ao passo que em outras ele pode não ser capaz do mesmo (HOLBROOK et al., 2002; MUNNS; KING, 1988).

2.5 O sistema colinérgico em estômatos

Células-guarda constituem cerca de 2%, ou menos, da população de células epidérmicas (WILLMER; PETROPOULOU; MANETAS, 1990) e constituem uma porcentagem ainda menor do total de células foliares. Madhavam et al. (1995) mostraram que

protoplastos de células-guarda de *Vicia faba* L. e *Nicotiana glauca* G. são ricos em AChE quando comparados com protoplastos de células do mesofilo indicando, assim, uma significância fisiológica para ACh e AChE nessas células. Além disso, observaram que a ACh exógena (1mM) induziu em 80% o fechamento estomático na epiderme abaxial de *V. faba* e que inibidores da AChE também promoveram esse efeito em graus distintos. Esses resultados colocaram o sistema colinérgico como uma potencial via de transdução de sinais em células-guarda.

Trabalhos posteriores obtiveram resultados diferentes de Madhavam et al. (1995), onde a ACh induzia a abertura estomática. Tal diferença pode estar relacionada à quantidade de ACh utilizada nos estudos, sendo que Madhavam et al. (1995) utilizaram 1mM do neurotransmissor, enquanto que outros estudos utilizaram ACh na ordem de μ M, ou seja, grandes quantidades da substância podem causar a dessensibilização dos receptores (LENG et al., 2000) e promover efeito oposto ao de baixas quantidades.

Wang, Wang e Lou (1999) demonstraram que a ACh induz abertura estomática em *V. faba*, mas sua rota de sinalização em células-guarda é desconhecida. Tem sido apresentadas evidências de que receptores nicotínicos e muscarínicos estão localizados em células guarda de *V. faba* e medeiam abertura estomática regulada por ACh (MENG et al., 2001; WANG et al., 1998). Análises por fluorescência mostram que receptores muscarínicos podem também estar presentes em membranas do cloroplasto (MENG et al., 2001).

Leng et al. (2000) demonstraram o papel regulatório da ACh e de seus antagonistas em canais específicos de entrada de K^+ em células-guarda de *V. faba*. Além disso, estudos mostram que o Ca^{2+} e a calmodulina estão envolvidos na resposta de células-guarda a ACh e que o sinal de Ca^{2+} está acoplado, possivelmente, a receptores muscarínicos na transdução de sinais nas células estomáticas (MENG et al., 2004; WANG et al., 2003).

A participação da ACh no movimento estomático está relacionada também com a dinâmica de microtúbulos e microfilamentos (HUANG; WANG; LOU, 2000).

Wang et al. (2003) demonstraram, em *Vicia faba*, que o estresse osmótico causou um decréscimo do conteúdo de ACh nas extremidades radiculares e na seiva xilemática, mesmo quando o potencial hídrico da parte aérea das plantas indicava hidratação ideal. Tal situação também causou um decréscimo no conteúdo de ACh na epiderme abaxial das folhas, fato que esteve altamente correlacionado a alterações na taxa de transpiração das plantas, sugerindo que o decréscimo da ACh provavelmente funcionou como um sinal para regular o comportamento estomático.

Assim, é concebível que em plantas o sistema mediado por ACh, composto de ACh, receptores e AChE, desempenhe um papel significativo na transdução de sinais, inclusive na resposta de plantas a estresses, como o faz em animais.

2.6 Estresse hídrico

O termo estresse, do ponto de vista biológico, é considerado como um desvio significativo das condições ótimas para a vida sendo um evento ou estado induzido no organismo. Tal condição causa mudanças e respostas no indivíduo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2000).

O estresse pode ser causado por fatores de origem biótica (plantas, microrganismos, animais, ações antropogênicas) e abiótica (radiação solar, temperatura, água, gases, minerais e efeitos mecânicos) (LARCHER, 2000).

Com relação à água, sendo esta um fator crucial para os vegetais, o aumento na prevalência de secas causam grandes impactos na produtividade agrícola (PASSIOURA, 2007) e na de ecossistemas (CIAIS et al., 2005) e distribuição de espécies (ENGELBRECHT et al., 2007).

O rendimento das culturas pode ser afetado mesmo em anos climaticamente favoráveis, se o déficit hídrico ocorrer no período crítico de desenvolvimento da cultura. Para o milho, durante o período vegetativo, o déficit hídrico reduz o crescimento da planta em função de decréscimos da área foliar e da biomassa (BERGAMASCHI et al., 2007). Porém, nesse período não estão sendo formados os componentes do rendimento. Assim, os efeitos sobre a produção de grãos são atenuados posteriormente, se as condições hídricas se tornarem favoráveis (KRON; SOUZA; RIBEIRO, 2009) o que poderá garantir níveis satisfatórios de produção de grãos.

O milho é relativamente tolerante ao déficit hídrico durante a fase vegetativa, porém demonstra extrema sensibilidade com decréscimo no rendimento de grãos se o déficit hídrico ocorrer na fase de reprodutiva (SANTOS; CARLESSO, 1998), em decorrência dos processos fisiológicos ligados à formação do zigoto e início do enchimento de grãos (SCHUSSLER; WESTGATE, 1991; ZINSELMEIER; WESTGATE; JONES, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) híbrido BF9719 (Monsanto).

3.2 Condições de crescimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos de Plantas sob Estresse da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da USP.

As sementes de milho foram colocadas para germinar no escuro a temperatura ambiente em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido com água destilada. Após cinco dias 40 plântulas foram transferidas para copos descartáveis (300 mL, diâmetro de 7 cm e profundidade de 11 cm) contendo vermiculita média expandida (Vermifloc Agro, Brasil Minérios) como substrato. Tais copos foram colocados em câmara de crescimento tipo B.O.D. com interior revestido com papel alumínio a fim de uniformizar a luminosidade, a $25\pm 1^\circ\text{C}$, sob luzes fluorescentes brancas de intensidade luminosa de $80\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h.

As plantas receberam inicialmente 100 mL de água deionizada, que era a capacidade de campo do substrato vermiculita, e a cada dois dias essa quantidade de água era completada, a fim de mantê-las com hidratação ótima. Uma vez na semana as plantas recebiam solução de água e nutrientes (Fertilizante Mineral Misto 13-13-15 + Micronutriente Nutriverde Vitaplan) até atingirem o estágio V5 (vegetativo com cinco folhas completamente desenvolvidas). Nesse ponto, as plantas já extinguíram as reservas da semente e se mantêm com a fotossíntese (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993).

Figura 2 – Planta de milho em estágio V5 com as cinco folhas completamente desenvolvidas

A partir desse momento, dois tratamentos foram estabelecidos: irrigação, contando com 20 plantas, sendo o grupo controle e estresse hídrico, com 20 plantas. Para o tratamento de estresse, a irrigação foi suspensa cinco dias antes das análises fisiológicas, ocasião na qual as plantas mostravam sinal de estresse (enrolamento das folhas) (CARLESSO, 1997; MOULIA, 2000).

3.3 Análises fisiológicas

3.3.1 Fotossíntese, condutância estomática e transpiração

As medições foram feitas com auxílio de analisador de gás por infravermelho (IRGA, modelo LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, EUA). Foram obtidas a taxa de assimilação de carbono (taxa fotossintética líquida) (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e transpiração estomática (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). As medições foram feitas em laboratório sob plataforma com cinco luzes incandescentes e quatro fluorescentes (irradiação total $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a temperatura na altura das plantas em torno de 25°C . As plantas foram colocadas para aclimatarem às condições do ambiente uma hora antes das análises. As condições de medida foram: $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ aproximadamente, utilizando um galão para amortecimento de variações da concentração de CO_2 no ar, temperatura ambiente de 25°C e $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos.

As medições foram realizadas na quarta (completamente expandida), quinta (última completamente expandida) e sétima (não expandida) folhas contadas a partir da base da planta, as quais estão aqui denominadas como folhas 4, 5 e 7 respectivamente. Uma folha completamente expandida é aquela que possui aurícula visível. O objetivo desta análise foi avaliar a influência da idade das folhas nos parâmetros fisiológicos.

A área foliar era ajustada a cada nova medida. Após as folhas serem pinçadas no sensor do aparelho, era aguardado que o coeficiente total de variação das medidas (Total CV) do LI-6400XT estivesse abaixo de 0,2 para se fazer o registro da leitura.

3.3.2 Potencial hídrico

Após medições com o IRGA foram retirados quatro discos (5 mm de diâmetro) de cada folha para análise do potencial hídrico (ψ) por psicrometria de termopar a efeito Peltier. Foi utilizado um micro-voltímetro (modelo HR-33T, WESCOR, Logan, EUA) acoplado a câmaras Wescor C52 e a leitura foi corrigida de acordo com a temperatura.

Para cada planta, a análise do potencial hídrico era feita imediatamente após a medição com o IRGA, a fim de se obter os dados em instantes de tempo próximos.

3.4 Ensaio para isolamento e purificação de acetilcolina

Após as análises fisiológicas, as folhas do milho foram coletadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para preservação do material vegetal. As amostras foram armazenadas em *freezer* sob temperatura de -80 °C até o momento da extração, que foi realizada no Laboratório “Max Feffer” de Genética de Plantas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

A metodologia de isolamento e purificação de ACh foi realizada de acordo com Hanin e Jenden (1969) com modificações introduzidas para material vegetal por Tretyn, Łukasiewicz-Rutkowska e Kopcewicz (1997). Foram utilizadas as folhas mais jovens (folha 7) das plantas de milho, pois segundo Tretyn e Kendrick (1991) as maiores concentrações de ACh são encontradas em partes jovens em crescimento.

Para extração o material vegetal foi imerso em nitrogênio líquido e macerado com auxílio de cadinho e pistilo até a obtenção de um pó. O material pulverizado foi subsequentemente homogeneizado com uma mistura resfriada contendo 15% de ácido fórmico 1N e 85% de acetona (1 mL por 100 mg de tecido) em tubos *Falcon* de 15 mL. Esses tubos foram agitados em agitador de tubo tipo *Vortex* três vezes por 15 s, sendo que entre as agitações eles foram resfriados por 15 s em banho de gelo.

O material homogeneizado foi resfriado por 30 min em banho de gelo, em seguida foi centrifugado por 30 min a 15000g e filtrado (papel filtro comum), sendo transferido para novos tubos e lavados com igual volume de éter etílico. Depois de breve centrifugação, a fase éter foi descartada. A lavagem foi repetida mais duas vezes e a fase éter removida. Para que todo éter evaporasse foi aguardado alguns minutos até que não se observasse diferença de fases no tubo.

Para cada 1 mL do material homogeneizado, foi adicionado 0,1 mL de cloreto de tetraetil-amônio 1mM e 1 mL de amônio reineckato 2% resfriado. O conteúdo dos tubos foi agitado, resfriado por 40 min em banho de gelo, e então centrifugados por 20 min a 0 °C. Foi aguardado que o precipitado resultante secasse. Em seguida, este foi dissolvido em 1 mL de solução de p-tolueno-sulfonato de prata 5mM em acetonitrila e depois de agitado por 1 min foi centrifugado. O sobrenadante foi transferido para tubos *Eppendorf* e secos em concentrador a vácuo (*Eppendorf Concentrator 5301*).

3.5 Pirólise (Pi), cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massas (MS)

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental do IQSC/USP.

Devido a propriedades não voláteis da ACh (como no caso de outras aminas quaternárias), ela deve ser transformada em uma amina terciária antes da determinação cromatográfica. Isso consiste na separação de um grupo metil (CH_3^-), o que resulta na formação de 2-(dimetilamino)etil éster que é volátil. Esse efeito pode ser obtido por degradação química da ACh ou como resultado de sua decomposição termal (pirólise) (WIŚNIEWSKA; TRETYN, 1999). Investigações prévias mostram que melhores resultados são obtidos quando se aplica o segundo método (TRETYN; ŁUKASIEWICZ-RUTKOWSKA; KOPCEWICZ, 1997; TRETYN et al., 1987).

Uso da pirólise acoplada à cromatografia gasosa e à espectrometria de massas é caracterizado por alta sensibilidade a colina e seus derivados e grande repetibilidade dos resultados (MOMONOKI; MOMONOKI, 1991; TRETYN; ŁUKASIEWICZ-RUTKOWSKA; KOPCEWICZ, 1997).

Dessa maneira, os extratos purificados e secos foram dissolvidos em 50 μL de acetonitrila. Desta solução, amostras de 4 μL foram submetidas a pirólise. Esta foi conduzida a 500 $^{\circ}\text{C}$ por 30 s por meio do pirolisador PY-2010iS (Frontier Lab, Saikon, Japão).

Os produtos gasosos gerados pela pirólise da amostra foram transportados pelo fluxo de gás até a coluna do cromatógrafo (GC-2010 Shimadzu, Kyoto, Japão) onde foram separados. Foi utilizada a coluna capilar CW-20M (Marcherey-Nagel, Alemanha) com as seguintes características: revestimento de polietileno glicol, comprimento de 25 m, diâmetro interno de 0,32 mm e filme com 0,25 μm de espessura. O cromatógrafo estava acoplado a um espectrômetro de massas (QP2010 Plus, Shimadzu).

As análises foram conduzidas segundo Wiśniewska e Tretyn (1999) nas seguintes condições: temperatura da coluna de 50 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, elevada a 160 $^{\circ}\text{C}$ na taxa de 20 $^{\circ}\text{C}$ por minuto, e então mantida a 160 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura do injetor e do detector foram ambas 240 $^{\circ}\text{C}$ e a da interface 250 $^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado He como gás de arraste a uma pressão de 50 KPa com *split* de 50 mL min^{-1} . Os tempos de retenção foram registrados e os picos foram integrados com o programa GCMS Solution (Shimadzu).

As substâncias detectadas pelo espectrômetro de massas foram identificadas pela comparação dos espectros de massa com a biblioteca do aparelho (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database).

Antes das amostras, foi injetado no sistema Pi-GC-MS um padrão externo (cloreto de acetilcolina), cujo solvente foi acetonitrila, a fim de confirmar se as condições de pirólise e cromatografia estavam adequadas a identificação do derivado da ACh e descobrir seu tempo de retenção.

3.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial (2x3). Os fatores foram: condição de água nos níveis de hidratação e estresse, e idade das folhas nos níveis folha 4 (mais velha), folha 5 (idade intermediária) e folha 7 (mais jovem).

As plantas foram divididas em 20 blocos, contendo uma planta hidratada e uma sob estresse cada e as análises fisiológicas feitas em três folhas.

3.7 Análises estatísticas

Os pressupostos para obtenção da análise de variância (ANOVA) foram investigados e as variáveis g_s e E foram transformadas utilizando a transformação ótima de Box-Cox (1964).

Satisfeitas as exigências do modelo estatístico, aplicou-se o teste F ($p < 0,05$) da ANOVA para verificar a interação entre os fatores e os efeitos principais dos mesmos nas variáveis respostas. Quando os efeitos foram significativos, aplicou-se o teste Tukey para comparação entre os níveis dos fatores.

As correlações entre os resíduos das variáveis ψ_f , g_s , E e A foram calculadas por meio do Coeficiente de Correlação de Pearson. As análises estatísticas foram realizadas no sistema SAS® (SAS/STAT, 2003).

4 RESULTADOS

4.1 Análises fisiológicas

As médias das variáveis potencial hídrico foliar (ψ_f , MPa), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e taxa fotossintética líquida (A, μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) relacionadas ao regime hídrico e a idade da folha estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das variáveis fisiológicas: potencial hídrico foliar (ψ_f , MPa), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e taxa fotossintética líquida (A, μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) das folhas 4, 5 e 7 de plantas de milho submetidas a duas condições hídricas

	Folha 4		Folha 5		Folha 7	
	Hidratação	Estresse	Hidratação	Estresse	Hidratação	Estresse
ψ_f	-1,35±1,83	-1,84±4,01	-1,31±2,37	-1,96±3,76	-1,32±2,10	-1,94±3,91
g_s	0,066±0,02	0,020±0,01	0,070±0,02	0,027±0,02	0,088±0,02	0,032±0,02
E	1,856±0,60	0,643±0,52	1,977±0,62	0,883±0,72	2,370±0,75	1,018±0,69
A	12,084±3,88	4,467±4,14	12,923±3,72	5,358±4,24	15,034±4,21	6,648±4,48

Dados apresentados como média±desvio-padrão

Os valores descritivos de probabilidade para as variáveis ψ_f , g_s , E e A são apresentados na Tabela 2. O fator água causou diferença significativa para todas as variáveis testadas. Já o fator idade da folha, só não apresentou diferença significativa para o potencial hídrico. Com relação à interação entre os fatores, esta não apresentou diferença estatística para nenhuma variável ($\alpha=5\%$).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância por meio do teste F para as variáveis: potencial hídrico foliar (ψ_f , MPa), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e taxa fotossintética líquida (A, μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) de plantas de milho hidratadas e sob estresse hídrico

Fatores	ψ_f	g_s	E	A
Água	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Folha	0,6597 ^{ns}	<0,0001*	<0,0001*	0,0024*
Água x Folha	0,2017 ^{ns}	0,6727 ^{ns}	0,5514 ^{ns}	0,7977 ^{ns}
Bloco	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
CV %	13,30	17,05	18,59	30,85

*Significativo (p<0,05); ^{ns} não significativo

Como não houve interação entre fatores, os efeitos principais destes foram investigados separadamente nos seguintes níveis: hidratação e estresse para o fator água e folhas 4, folhas 5 e folhas 7, para o fator idade, sendo a quarta a mais velha e a sétima a mais jovem.

Todos os parâmetros fisiológicos (ψ_f , g_s , E e A) diferiram significativamente entre os níveis hidratação e estresse do fator água (Tabela 3).

Tabela 3 – Teste de comparação de médias para o fator água em relação às variáveis potencial hídrico foliar (ψ_f , MPa), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e taxa fotossintética líquida (A, μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) das folhas 4, 5 e 7 de plantas de milho

	Hidratação	Estresse
ψ_f	-1,33a	-1,89b
g_s	0,075a	0,026b
E	2,068a	0,848b
A	13,43a	5,49b

Valores acompanhados por letras diferentes na linha representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Com relação à idade das folhas, a variável ψ_f se mostrou estatisticamente igual para todas elas. Por outro lado, folhas 4 e 5 se mostraram estatisticamente igual para as variáveis g_s , E e A, diferindo da folha 7 nos mesmos parâmetros (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de comparação de médias para o fator idade da folha em relação às variáveis potencial hídrico foliar (ψ_f , MPa), condutância estomática (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiração (E, mmol H₂O m⁻² s⁻¹) e taxa fotossintética líquida (A, μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) de plantas de milho submetidas a duas condições hídricas

	Folha 4	Folha 5	Folha 7
ψ_f	-1,59a	-1,64a	-1,59a
g_s	0,043b	0,049b	0,060a
E	1,25b	1,43b	1,69a
A	8,28b	9,14b	10,84a

Valores acompanhados por letras diferentes na linha representam diferença significativa ($p < 0,05$)

Os resultados fisiológicos (Tabelas 3 e 4) estão em concordância com as respostas a estresse hídrico comumente encontradas para outras espécies vegetais, tais como decréscimo em g_s , E e A.

O déficit hídrico reduziu em aproximadamente 59% a transpiração, em 65% a condutância estomática e em 59% a fotossíntese das plantas de milho (Tabela 3). As duas últimas variáveis apresentaram alta correlação ($r=0,82988$). Isso indica que as reduções de A foram devido a decréscimo em g_s que por sua vez ocorreu devido ao déficit hídrico das plantas como indicado pelo baixo potencial da água (-1,89MPa). Porém o potencial da água das folhas teve baixa correlação com a condutância estomática ($r=0,23840$).

4.2 Análises cromatográficas

Após análises cromatográficas das quarenta folhas não foi detectado o derivado da acetilcolina, 2-(dimetilamino)etil éster. Por esse motivo, não são apresentados os espectros de massa dos compostos. As figuras 1 a 40 (Anexo B) indicam os cromatogramas das análises das folhas número 7 das 20 plantas de milho hidratadas e das 20 submetidas a estresse hídrico.

Antes das amostras, foi testado um padrão externo, cloreto de acetilcolina, que após pirólise e passagem pelo sistema de cromatografia e espectrometria foi identificado por comparação com a biblioteca de compostos do espectrômetro como 2-(dimetilamino)etil éster (Anexo A).

5 DISCUSSÃO

Dentre os fatores que podem determinar estresse, a água é o fator predominante na determinação da distribuição geográfica da vegetação em escala global. Na agricultura, a ocorrência de déficit hídrico causa grandes prejuízos aos produtores. Espécies que possuem sensibilidade a estresse por falta de água, como o milho, tem seu rendimento diminuído nessa condição, principalmente se ela ocorrer no período crítico da cultura que é o de pendoamento-espigamento (BERGONCI et al., 2001; MATZENAUER et al., 1995).

A condição hídrica das plantas representa a integração da demanda evaporativa atmosférica, do potencial de água no solo, da densidade e distribuição radicular, bem como de outras características da planta associadas às suas relações com o meio. Com isso, mudanças nesses pontos de integração poderão modificar os fluxos de água no sistema solo-planta-atmosfera (BERGONCI, 1997).

Nesse contexto, surge um conceito muito importante, o de potencial hídrico ou potencial da água (ψ). O valor do potencial da água indica a diferença entre o estado energético da mesma no sistema considerado e no estado de referência, que por convenção é zero. Assim, varia de valores próximos de zero nas plantas sem estresse, até valores bem abaixo de zero ou igual ao potencial osmótico, em plantas com estresse severo (KRAMER; BOYER, 1995). Sabendo-se que energia por volume tem dimensão igual à pressão, assim o potencial da água pode ser expresso em unidades de pressão (ex. MPa).

Mesmo com variações ao longo do dia – estresse de curto prazo –, em plantas irrigadas, o potencial da água na folha (ψ_f) tem sido utilizado em estudos das relações hídricas dos vegetais (HSIAO, 1973), e é considerado padrão do estado hídrico da planta.

Quando o conteúdo de água no solo decresce, o potencial da água no solo e na folha também decresce e, como consequência, o déficit hídrico se desenvolve nas folhas e as células-guardas perdem turgor, causando fechamento estomático (GUBIANI, 2008). De fato, no presente trabalho, plantas que tiveram a irrigação suspensa mostraram uma sensível redução de g_s (Tabela 3). Valores significativamente menores de potencial hídrico e condutância estomática são suficientes para constatar o estado de estresse nas plantas deste estudo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Conforme Salisbury e Ross (1992), pode-se considerar a condutância foliar como uma medida da permeabilidade com que a água e o CO_2 difundem-se através da folha, sendo o fluxo difusivo proporcional à força impulsora e inversamente proporcional à resistência. A condutância foliar ao vapor d'água é constituída pelas condutâncias estomática, cuticular e dos espaços intercelulares. Dentre elas, a condutância estomática assume maior importância

por ser a principal via por onde ocorrem trocas gasosas entre a planta e o meio externo e que pode ser regulada via abertura do ostíolo.

A resposta mais comum ao estresse hídrico é o fechamento estomático, que provoca reduções na taxa de fotossíntese, pois reduz a disponibilidade de CO₂ (SANTOS et al., 2009). Neste trabalho o estresse hídrico reduziu a condutância estomática, causando redução da difusão de CO₂ da atmosfera para o local de carboxilação reduzindo a taxa fotossintética líquida (Tabela 3). Em longo prazo, a redução na fotossíntese provocaria uma limitação do crescimento das plantas devido ao desequilíbrio de carbono, que depende da interação entre fotossíntese e respiração (FLEXAS et al., 2006). A falta d'água causa efeito também no aparato fotossintético, tal como um decréscimo na eficiência da carboxilação (CALBO; MORAES, 1997; LEIDI et al., 1993).

Segundo Pereira et al. (2003) a condutância foliar é o indicador fisiológico que melhor se correlaciona com a fotossíntese em diferentes condições de disponibilidade hídrica. Neste trabalho a condutância estomática esteve altamente correlacionada com a taxa fotossintética líquida ($r=0,82988$).

Conforme Jones (1985), o fechamento estomático pode ocorrer dentro de uma larga faixa de potencial de água na folha, dependendo da espécie. Turner (1974) demonstrou que os estômatos de milho se fecham com potenciais de água na folha em torno de -1,7 MPa. Já Bergonci (1997), Bono et al. (2001) e Bianchi (2004) verificaram que houve diminuição na condutância estomática do milho quando o potencial da água na folha atingiu ao valor de -1,5 MPa.

No presente trabalho, houve diminuição de g_s das três folhas de milho analisadas quando o potencial da água atingiu valores de -1,84, -1,96 e -1,94 MPa, nas folhas 4, 5 e 7 respectivamente (Tabela 1), valores similares aos encontrados por Jones (1985).

Foi observada também baixa correlação entre ψ_f e g_s ($r=0,23840$) e entre ψ_f e A ($r=0,2518$). Tal fato está em concordância com estudos de Schulze (1986) e Turner (1986), que indicam que g_s e A se correlacionam melhor com o potencial hídrico do solo e de raízes do que com o potencial hídrico da folha. A mesma resposta foi observada por Rosa, Dillenburg e Rorseth (1991) estudando a resposta heliotrópica de folhas de soja submetida à condição de déficit hídrico.

Diversos trabalhos relataram que o ácido abscísico (ABA), produzido na raiz pode desempenhar um papel importante no controle de g_s . Para Schurr, Gollan e Schulze (1992), g_s diminui com a redução do conteúdo de água no solo, mesmo que a parte aérea permaneça túrgida devido a maior síntese de ABA nas raízes estressadas.

Por outro lado, com relação à ACh, Wang et al. (2003) demonstraram em *Vicia faba* cultivada em modo *split-root* (as raízes foram divididas em duas partes iguais, colocadas em recipientes separados, sendo que em um deles foi gerado estresse osmótico) que o decréscimo no conteúdo de ACh nas folhas esteve altamente correlacionado com o decréscimo na taxa transpiratória.

Levando-se em conta que em condições ideais de hidratação, certa quantidade de ACh é sintetizadas nas raízes e transportada para parte aérea para manter a funcionalidade dos estômatos (LOU; HUA, 2000), a simples interpretação do dado anterior é que a ACh pode coordenar sua ação com o ABA. Similarmente a este hormônio, a ACh das raízes pode agir como mensageiro primário, isto é, regular o movimento estomático diretamente. O ato de coordenação da ACh com o ABA pode ser mais benéfico para a precisa medição do *status* hídrico ao redor das raízes, assim, o estômato não seria fechado pela frequente flutuação da quantidade de água disponível para o sistema radicular. Esse mecanismo permite a otimização do crescimento da planta sob déficit hídrico (WANG et al., 2003).

Com relação à transpiração, Taiz e Zeiger (2009) a definem como um processo que envolve a evaporação da água da superfície das células do mesófilo para os espaços intercelulares das folhas e a difusão do vapor de água das folhas para o meio.

Para Bergonci e Pereira (2002), a transpiração é dependente em grande parte da condutância estomática e esta diminui em função da fração de água disponível para a planta e da incidência de radiação fotossinteticamente ativa. Coerentemente, neste estudo, foi encontrada alta correlação entre g_s e E ($r=0,96404$).

Quando plantas são atendidas por suprimento de água, na qualidade e na quantidade para o consumo, o fluxo transpiratório é determinado basicamente por sua área foliar e por elementos meteorológicos que comandam a demanda evaporativa (DALMAGO et al., 2006).

Em condições limitantes de água, a regulação da abertura estomática e crescimento foliar foram demonstrados como sendo os fatores mais importantes no controle das perdas de água por transpiração. Esses ajustes metabólicos, em geral, não afetam a morfologia de raízes e folhas, crescimento e produção de biomassa se a disponibilidade de água está nos limites da variação diária (BANO et al., 1993).

No presente estudo, a taxa fotossintética líquida variou de 12 a 15 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para as três folhas das plantas com hidratação ótima (Tabela 1). Tais valores são baixos quando comparados a plantas hidratadas crescendo expostas ao sol. Por exemplo, Lopes et al. (2009) obtiveram, também em milho, valores máximos de A de 45 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O mesmo aconteceu para condutância estomática, que variou de aproximadamente 0,06 a 0,08 mol H₂O m⁻² s⁻¹, e para transpiração que variou de aproximadamente 1,8 a 2,3 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ para as três folhas analisadas com hidratação ótima. Comparativamente, Lopes et al. (2009) obtiveram resultados máximos de condutância de aproximadamente 0,6 mol H₂O m⁻² s⁻¹ e transpiração de 10 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ em testes em condições de campo.

Os baixos valores para fotossíntese, transpiração e condutância neste trabalho são explicados pelo fato de as plantas terem crescido sob baixa radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (80 μmol m⁻² s⁻¹) e as medidas terem sido realizadas também sob baixa radiação (120 μmol m⁻² s⁻¹). Pode ser que as luzes fluorescentes e incandescente da B.O.D. e da plataforma de medida não forneceram luz no comprimento de onda do azul, radiação extremamente importante para abertura estomática (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dessa maneira transpiração e fotossíntese decresceram com a condutância estomática, como mostram os valores de correlação (g_s e E , $r=0,96404$; g_s e A , $r=0,82988$). Adicionalmente valores baixos de PAR não permitem que o aparato fotossintético dos cloroplastos atue na sua máxima atividade.

Com relação ao fator idade das folhas, segundo Taiz e Zeiger (2009) folhas jovens apresentam maiores valores de A , g_s e E . Já folhas maduras e senescentes apresentam valores baixos para tais parâmetros, já que começam a ter degradação de clorofila e remobilização de nutrientes para outras partes da planta.

O que aconteceu neste trabalho foi que A , g_s e E tiveram valores estatisticamente iguais para folhas 4 e 5 completamente expandidas (Tabela 4), o que era esperado pois estão muito próximas quanto a sua inserção na planta e têm aproximadamente a mesma idade. Dessa maneira estão praticamente nas mesmas condições. Se as plantas estivessem em estágio mais avançado do desenvolvimento, folhas distantes e com maior diferença de idade apresentariam parâmetros fisiológicos significativamente diferentes.

As folhas 4 e 5, apesar de não estarem em senescência, diferiram estatisticamente das folhas 7, que apesar de não completamente expandidas, apresentaram valores maiores de A , g_s e E (Tabela 4). O aumento na atividade fotossintética durante sua expansão é devido ao maior nível de clorofila por unidade de área foliar, à elevação na atividade de enzimas carboxilativas e à diminuição da resistência estomática (LARCHER, 2000).

Quanto ao ψ_f , as três folhas analisadas dentro de cada tratamento não diferiram entre si, pois elas estão próximas umas das outras e sujeitas às mesmas condições (Tabela 4).

No presente trabalho não foi detectada ACh em folhas de milho sob qualquer condição hídrica (Anexos A e B). O fato de não encontrar ACh não invalida a hipótese deste trabalho já que a ocorrência desse neurotransmissor em plantas de milho foi demonstrada,

tanto em sementes (MIURA; SHIH, 1984) quanto em folhas (ROSCHINA, 1991). Foi demonstrado ainda, por Wang et al (2003), a participação da ACh na indução da abertura estomática em *Vicia faba* e forte correlação entre sua concentração e a transpiração.

Dessa maneira algumas hipóteses foram levantadas para tentar explicar o resultado negativo para detecção de ACh e alternativas para resolver essas questões:

- Houve falha no processo de extração. Deve-se reavaliar tal processo e buscar soluções em outras metodologias;
- A enzima AChE degradou a ACh antes ou durante o processo de extração;
- A ACh estava em baixíssimas concentrações nas folhas e desse modo ficou abaixo do limite de sensibilidade para sua detecção pelo sistema GCMS. Poderia ser usada maior quantidade de tecido vegetal para a extração;
- A quantidade de 4 µL usada na pirólise não foi suficiente para detecção da ACh, assim deve-se utilizar uma concentração maior;
- As plantas não produziram ACh devido a baixa quantidade de luz na B.O.D. O experimento poderia ter sido montado em casa de vegetação;

Os estudos de Hartmann e Kilbinger (1974a,b) claramente demonstram que a exposição a luz promoveu a síntese de ACh, ao passo que o escuro favoreceu a ausência de ACh em plantas superiores e inferiores. Miura e Shih (1984) encontraram resultados similares em plantas de *Phaseolus aureus* para relação entre nível de acetilcolina em folhas e exposição à luz.

Quanto aos compostos identificados por espectrometria de massas (Anexo B), não é possível afirmar que tais substâncias estavam presentes nas plantas de milho já que o material vegetal foi submetido à pirólise e essa técnica degrada quimicamente as moléculas por energia térmica, sendo as substâncias detectadas diferentes das originais.

Nos últimos anos, consideráveis esforços têm sido feitos para responder a questão de como as plantas percebem a disponibilidade de água no sistema radicular (JENSEN et al., 1998; STEUDLE, 2000) e como o status hídrico do solo é comunicado das raízes para a parte aérea (JACKSON, 1993). É bem estabelecido que interações complexas entre pH e presença de nitrato na seiva xilemática e concentrações de ABA estão envolvidas na transdução de sinais de seca da raiz para parte aérea (ALI; JENSSEN; MOGENSEN, 1998). No entanto, foi demonstrado que as respostas dos componentes na cadeia de transdução de sinais variam significativamente entre cultivos (LIU; JENSEN; ANDERSEN, 2003; LIU et al., 2005) e

situações de estresse (GOLLAN; TURNER; SCHULZE, 1985) e são, até o presente, difíceis de extrapolar para situações de campo.

Até agora, não temos a clara ideia de como a sensibilidade estomática é controlada. Como discutido anteriormente, foi sugerido que citocininas e ACh desempenham um papel crucial na regulação do movimento estomático em condições normais. Uma vez que essas substâncias são bem estabelecidas como sendo antagonistas da ação do ABA nos estômatos, não importa se o estresse hídrico possa ser capaz de induzir significantes mudanças nos seus transportes a longa distância, essas substâncias tem papel potencial na modulação de respostas estomáticas ao sinal do ABA derivado de raízes (JIA; ZHANG, 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas plantas de milho sob estresse hídrico ocorreu acentuada diminuição da condutância estomática, da transpiração e da fotossíntese. Além disso, tais variáveis estiveram altamente correlacionadas. Já o potencial hídrico teve baixa correlação com esses parâmetros.

No presente estudo não foi possível a detecção de ACh nas folhas das plantas de milho, embora esta tenha sido identificada em diversas pesquisas semelhantes usando o mesmo protocolo de extração e determinação. Uma análise cuidadosa deve ser feita a fim de identificar a causa da não detecção de acetilcolina. Estudos mais aprofundados, e até mesmo melhorias nas técnicas utilizadas precisam ser realizados para que seja possível identificar tal biomediador em plantas de milho.

O papel de neurotransmissores em plantas merece mais atenção por parte dos fisiologistas, independente da abordagem ser clássica ou neurofisiológica e independentemente de atuarem em processos de sinalização como nos animais. Cabe ainda estudar a relação entre neurotransmissores e hormônios vegetais e avançar os estudos para situações de campo.

REFERÊNCIAS

- ALI, M.; JENSSEN, C.R.; MOGENSEN, V.O. Early signals in field-grown wheat in response to shallow soil drying. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, n. 8, p. 871-882, 1998.
- BALUŠKA, F.; ŠAMAJ, J.; MENZEL, D. Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 282-285, 2003.
- BALUŠKA, F.; VOLKMANN, D.; MENZEL, D. Plant synapses: actin-based adhesion domains for cell-to-cell communication. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 106-111, 2005.
- BAMEL, K.; GUPTA, S.C.; GUPTA, R. Acetylcholine causes rooting in leaf explants of in vitro raised tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) seedlings. **Life Sciences**, New York, v. 80, n. 24-25, p. 2393-2396, 2007.
- BANO, A.; DÖRFFLING, K.; BETTIN, D.; HAHN, H. Absciscic acid and cytokinins as a possible root-to-shoot signal in xylem sap of rice plants in drying soil. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 20, n. 1, p. 109-115, 1993.
- BERGAMASCHI, H.; WHEELERLL, T.R.; CHALLINORLL, A.J.; COMIRANL, F.; HECKLER, B.M.M. Maize yield and rainfall on different spatial and temporal scales in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 603-613, 2007.
- BERGONCI, J.I. **Avaliação de indicadores de déficit hídrico em milho**. 1997. 111 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- BERGONCI, J.I.; PEREIRA, P.G. Comportamento do potencial da água na folha e da condutância estomática do milho em função da fração de água disponível no solo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 229-235, 2002.
- BERGONCI, J.I.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A.O.; FRANÇA, S.; RADIN, B. Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 7, p. 949-956, 2001.
- BIANCHI, C.A.M. **Avaliação de indicadores da condição hídrica em milho sob diferentes níveis de água, em semeadura direta e convencional**. 2004. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- BLUSZTAJN, J.K.; LISCOVITCH, M.; RICHARDSON, U.I.; WURTMAN, R.J. Phosphatidylcholine as a precursor of choline for acetylcholine synthesis. In: DAWDALL, M.J.; HAWTHORNE, J.N. (Ed.). **Cellular and molecular basis of cholinergic function**. Chichester: Ellis Horwood, 1987. p. 341-346.
- BONO, L.; BERGAMASCHI, H.; ROSA, L.M.G.; FRANÇA, S.; RADIN, B.; SANTOS, A.O.; BERGONCI, J.I. Alterações no padrão de resposta à luz da condutância estomática do milho causadas pelo déficit hídrico. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 27-34, 2001.

BRENNER, E.D.; STAHLBERG, R.; MANCUSO, S.; VIVANCO, J.; BALUŠKA, F.; Van VOLKENBURGH, E. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 413-419, 2006.

BURDON-SANDERSON, J. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionea muscipula* in the excited and unexcited states. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 21, n. 139/147, p. 491-496, 1873.

CALBO, M.E.R.; MORAES, J.A.P.V. Fotossíntese, condutância estomática, transpiração e ajustamento osmótico de plantas de buriti submetidas a estresse hídrico. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 9, n. 2, p. 117-123, 1997.

CARLESSO, R. Enrolamento e orientação de folhas de milho causada por déficits hídricos. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 5, n. 1, p. 171-176, 1997.

CIAIS, P.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A.; OGEE, J.; ALLARD, V.; AUBINET, M.; BUCHMANN, N.; BERNHOFER, C.; CARRARA, A.; CHEVALLIER, F.; NOBLET, N.; FRIEND, A.D.; FRIEDLINGSTEIN, P.; GRÜNWALD, T.; HEINESCH, B.; KERONEN, P.; KNOHL, A.; KRINNER, G.; LOUSTAU, D.; MANCA, G.; MATTEUCCI, G.; MIGLIETTA, F.; OURCIVAL, J.M.; PAPALE, D.; PILEGAARD, K.; RAMBAL, S.; SEUFERT, G.; SOUSSANA, J. F.; SANZ, M.J.; SCHULZE, E.D.; VESALA, T.; VALENTINI, R. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. **Nature**, London, v. 437, n. 7058, p. 529-533, 2005.

DALMAGO, G.A.; HELDWEIN, A.B.; NIED, A.H.; GRIMM, E.L.; PIVETTA, C.R. Evapotranspiração máxima da cultura de pimentão em estufa plástica em função da radiação solar, da temperatura, da umidade relativa e do déficit de saturação do ar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 785-792, 2006.

DAVIES, E. Action potentials as multifunctional signals in plant: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 10, n. 8, p. 623-631, 1987.

_____. New functions for electrical signals in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 3, p. 607-610, 2004.

DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 55-76, 1991.

DENNISON, K.L.; SPALDING, E.P. Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, n. 4, p. 1511-1514, 2000.

DUBOS, C.; HUGGINS, D.; GRANT, G.H.; KNIGHT, M.R.; CAMPBELL, M.M. A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. **Plant Journal**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 800-810, 2003.

DUNANT, Y.; BABEL-GUERIN, E.; DROZ, D. Calcium metabolism and acetylcholine release at the nerve-electroplaque junction. **Journal de Physiologie**, Paris, v. 76, n. 5, p. 471-478, 1980.

EMMELIN, N.; FELDBERG, W. The mechanism of the sting of the common nettle (*Urtica urens*). **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 106, n. 4, p. 440-455, 1947.

ENGELBRECHT, B.M.J.; COMITA, L.S.; CONDIT, R.; KURSAR, T.A.; TYREE, M.T.; TURNER B.L.; HUBBELL, S.P. Drought sensitivity shapes species distribution patterns in tropical forests. **Nature**, London, v. 447, n. 7140, p. 80-82, 2007.

EVANS, M.L. Promotion of cell elongation in *Avena* coleoptiles by acetylcholine. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 50, n. 3, p. 414-416, 1972.

EWINS, A.J. Acetylcholine, a new active principle of ergot. **The Biochemical Journal**, London, v. 8, n. 1, p. 44-49, 1914.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2.ed. Piracicaba: Livrocere, 2004. 360 p.

FLEXAS, J.; BOTA, J.; GALMÉS, J.; MEDRANO, H.; RIBAS-CARBÓ, M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 3, p. 343-352, 2006.

FLUCK, R.A.; JAFFE, M.J. The acetylcholine system in plants. In: SMITH, E. (Ed.) **Current advances in plant sciences**. Oxford: Sciences, Engineering, Medical and Data Ltd. 1974a. v. 5, p. 1-22.

_____. The distribution of cholinesterase in plant species. **Phytochemistry**, New York, v. 13, n. 11, p. 2475-2480, 1974b.

FORDE, B.G.; LEA, P. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2339-2358, 2007.

FORNACIARI, S.; ANCESCHI, E.; ARRU, L. Role of acetylcholine in plant cell elongation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT NEUROBIOLOGY, 5., 2009, Florence. **Book of Abstracts**, Florence: UNIFI, 2009. p. 64.

GOLLAN, T.; TURNER, N.C.; SCHULZE, E.D. The responses of stomata and leaf gas exchange to vapor pressure deficits and soil water content. **Oecologia**, Berlin, v. 65, n. 3, p. 356-362, 1985.

GONG, X.Q.; BISSON, M.A. Acetylcholine-activated Cl⁻ channel in the *Chara* tonoplast. **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 188, n. 2, p. 107-113, 2002.

GRANDO, S.A.; KAWASHIMA, K.; WESSLER, I. Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans. **Life Sciences**, New York, v. 72, n. 18/19, p. 2009-2012, 2003.

GUBIANI, P.I. **Tempo para a ocorrência da resistência à penetração restritiva ao feijoeiro em solo com diferentes estados de compactação**. 2008. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HANIN, I.; JENDEN, D.J. Estimation of choline esters in brain by a new gas chromatographic procedure. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 837-845, 1969.

HARTMANN, E.; GUPTA, R. Acetylcholine as a signaling system in plants. In: BOSS, W.F.; MORRÉ, D.J. (Ed.). **Second messengers in plant growth and development**. New York: A. R. Liss, 1989. p. 257-288.

HARTMANN, E.; KILBINGER, H. Gas-liquid chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus. **The Biochemical Journal**, London, v. 137, n. 2, p. 249-252, 1974a.

_____. Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. **Experientia**, Basel, v. 30, n. 12, p. 1387-1388, 1974b.

HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; CANO, A.; ARNAO, M.B. Melatonin: a growth stimulating compound present in lupin tissues. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 1, p. 140-144, 2004.

HOLBROOK, N.M.; SHASHIDHAR, V.R.; JAMES, R.A.; MUNNS, R. Stomatal control in tomato with ABA-deficient response of grafted plants to soil drying. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 373, p. 1503-1514, 2002.

HOLTZ, P.; JANISCH, H. Über das vorkommen von azetylcholin, histamin und adenosin in pflanzen. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Heidelberg, v. 187, n. 2/5, p. 336-343, 1937.

HORIUCHI, Y.; KIMURA, R.; KATO, N.; FUJII, T.; SEKI, M.; ENDO, T.; KATO, T.; KAWASHIMA, K. Evolutional study on acetylcholine expression. **Life Sciences**, New York, v. 72, n. 15, p. 1745-1756, 2003.

HOSHINO, T. Effects of acetylcholine on the growth of the *Vigna* seedlings. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 24, n. 3, p. 551-556, 1983.

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 519-570, 1973.

HUANG, R.F.; WANG, X.C.; LOU, C.H. Stomatal opening induced by acetylcholine is associated with cytoskeletal components. **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v. 42, n. 6, p. 559-563, 2000.

JACKSON, M.B. Are plant hormones involved in root to shoot communication? **Advances in Botanical Research**, London, v. 19, p. 103-187, 1993.

JAFFE, M.J. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetylcholine. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 46, n. 6, p. 768-777, 1970.

JENSEN, C.R.; MOGENSEN, V.O.; POULSEN, H.H.; HENSON, I.E.; AAGOT, S.; HANSEN, E.; ALI, M.; WOLLENWEBER, B. Soil water matric potential rather than water content determines drought responses in field-grown lupin (*Lupinus angustifolius*). **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, n. 3, p. 353-363, 1998.

JIA, W.; ZHANG, J. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 3, n. 10, p. 772-777, 2008.

JONES, C.A. **C4 grasses and cereals: growth, development and stress response**. New York: John Wiley & Sons, 1985. 419 p.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 9, n. 1, p. 2063-2085, 2004.

_____. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000.

_____. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, New York, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.

KAWASHIMA, K.; MISAWA, H.; MORIWAKI, Y.; FUJII, Y.; FUJII, T.; HORIUCHI, Y.; YAMADA, T.; IMANAKA, T.; KAMEKURA, M. Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous system. **Life Sciences**, New York, v. 80, n. 24/25, p. 2206-2209, 2007.

KELLY, R.B.; DEUTSCH, J.W.; CARLSON, S.S.; WAGNER, J.A. Biochemistry of neurotransmitter release. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 2, p. 399-466, 1979.

KHALIL, A.A.M.; GRACE, J. Does xylem sap ABA control the stomatal behaviour of water-stressed sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 1127-1134, 1993.

KHURANA, J.P.; TAMOT, B.K.; MAHESHWARI, N.; MAHESHWARI, S.C. Role of catecholamines in promotion of flowering in short-day duckweed, *Lemna paucicostata*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 85, n. 1, p. 10-12, 1987.

KIRKPATRICK, C.J.; BITTINGER, F.; UNGER, R.E.; KRIEGSMAN, J.; KILBINGER, H.; WESSLER, I. The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathophysiological significance. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 85, n. 1, p. 24-28, 2001.

KOLAR, J.; MACHACKOVA, I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. **Journal of Pineal Research**, Copenhagen, v. 39, n. 4, p. 333-341, 2005.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 495 p.

KRON, A.P.; SOUZA, G.M.; RIBEIRO, R.V. Water deficiency at different developmental stages of glycine max can improve drought tolerance. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 43-49, 2008.

KURCHII, B.A. Acetylcholine and ethylene: do they share similar receptors and biological action? **Ukrainica Bioorganica Acta**, Kiev, v. 7, n. 1, p. 36-44, 2009.

LAM, H.M.; CHIU, J.; HSIEH, M.H.; MEISEL, L.; OLIVEIRA, I.C.; SHIN, M.; CORUZZI, G. Glutamate-receptor genes in plants. **Nature**, London, v. 396, p. 125-126, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531 p.

LAWSON, V.R.; BRADY, R.M.; CAMPBELL, A.; KNOX, B.G.; KNOX, G.D.; WALLS, R.L. Interaction of acetylcholine chloride with IAA, GA₃, and red light in the growth of excised apical coleoptile segments. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v. 105, n. 3, p. 187-191, 1978.

LEES, G.L.; LAHUE, R.; THOMPSON, J.E. Changes in the acetylcholine titre of senescing cotyledons. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 1117-1124, 1978.

LEIDI, E.O.; LOPEZ, J.M.; LOPEZ, M.; GUTIERREZ, J.C. Searching for tolerance to water stress in cotton genotypes: photosynthesis, stomatal conductance and transpiration. **Photosynthetica**, Praga, v. 28, n. 3, 383-390, 1993.

LENG, Q.; HUA, B.; GUO, Y.; LOU, C. Regulating role of acetylcholine and its antagonists in inward rectified K⁺ channels from guard cell protoplasts of *Vicia faba*. **Science in China**, Beijing, v. 43, n. 2, p. 217-224, 2000.

LI, J.; ZHU, S.; SONG, X.; SHEN, Y.; CHEN, H.; YU, J.; YI, K.; LIU, Y.; KARPLUS, V.J.; WU, P.; DENG, X.W. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 2, p. 340-349, 2006.

LIU, F.; JENSEN, C.R.; ANDERSEN, M.N. Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, n. 1, p. 65-70, 2003.

LIU, F.; ANDERSEN, M.N.; SHAHANZARI, A.; JACOBSEN, S.E.; JENSEN, C.R. ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato during progressive soil drying. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 3, p. 831-836, 2005.

LOPES, J.P.; MACHADO, E.C.; DEUBER, R.; MACHADO, R.S. Análise de crescimento e trocas gasosas na cultura de milho em plantio direto e convencional. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 839-848, 2009.

LOU, C.H. Integrated action in plant irritability. In: KUNG, S.D.; YANG, S.F. (Ed.). **Discoveries in plant biology**. Singapore: World Scientific, 1998. v. 2, p. 327-347.

LOU, C.H.; HUA, B.G. Plant signaling system. **Chinese Bulletin of Life Sciences**, Beijing, v. 12, n. 2, p. 49-51, 2000.

MacINTOSH, F.C. Acetylcholine. In: SIEGEL, G.J.; ALBERES, R.W.; AGRANOFF, B.W.; KAZMAN, R. (Ed.). **Basic neurochemistry**. Boston: Little Brown and Co., 1981. p. 183-204.

MADHAVAN, S.; SARATHA, G.; LEE, B.H.; PEGDEN, R.S. Guard cell protoplasts contain acetylcholinesterase activity. **Plant Science**, Limerick, v. 109, n. 2, p. 119-127, 1995.

MARQUARDT, P.; SCHUMACHER, H.; VOGG, G. Die chemisch konstitution des blutdrucksenkenden factors in der kartoffel. **Arzneimittelforschung**, Berlin, v. 2, n. 7, p. 301-304, 1952.

MATZENAUER, R.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M.A.; RIBOLDI, J. Relações entre rendimento de milho e variáveis hídricas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 3, n. 3, p. 85-92, 1995.

McQUEEN, J.K. Classical transmitters and neuromodulators. In: FLUCKIGER, E.; MULLER, E.E.; THORNER, M.O. (Ed.). **Basic and Clinical Aspects of Neuroscience**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. v. 2: Transmitter molecules in the brain, p. 7-16.

MENG, F.; LIU, X.; ZHANG, S.; LOU, C. Localization of muscarinic acetylcholine receptor in plant guard cells. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 46, n. 7, p. 590-591, 2001.

MENG, F.; MIAO, L.; ZHANG, S.; LOU, C. Ca^{2+} is involved in muscarin-acetylcholine-receptor-mediated acetylcholine signal transduction in guard cells of *Vicia faba* L. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 49, n. 5, p. 471-475, 2004.

MIURA, G.A.; SHIH, T.-M. Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, n. 3, p. 417-421, 1984.

MOMONOKI, Y.S. Occurrence of acetylcholine-hydrolyzing activity at the stele-cortex interface. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 99, n. 1, p. 130-133, 1992.

MOMONOKI, Y.S.; MOMONOKI, T. Changes in acetylcholine levels following leaf wilting and leaf recovery by heat stress in plant cultivars. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 283-290, 1991.

MOULIA, B. Leaves as shell structures: double curvature, auto-stresses, and minimal mechanical energy constraints on leaf rolling in grasses. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, n. 1, p. 19-30, 2000.

MUKHERJEE, I. The effect of acetylcholine on hypocotyl elongation in soybean. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 21, n. 8, p. 1657-1660, 1980.

MUNNS, R.; KING, R.W. Absciscic acid is not the only stomatal inhibitor in transpiration stream of wheat plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 88, n. 3, p. 703-708, 1988.

MURCH, S.J. Neurotransmitters, neuroregulators and neurotoxins in plants. In: BALUŠKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Ed.). **Communication in plants**: Neuronal aspects of plant life. Berlin: Springer-Verlag, 2006. chap. 10, p. 137.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J.; RUGGIERO. **The human nervous system**: structure and function. 6.ed. New Jersey: Human Press, 2005. 477 p.

- PALANIVELU, R.; BRASS, L.; EDLUND, A.F.; PREUSS, D. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. **Cell**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 47-59, 2003.
- PASSIOURA J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 113-117, 2007.
- PEREIRA, P.G.; BERGONCI, J.I.; BERGAMASCHI, H.; ROSA, L.M.G.; FRANÇA, S. Efeitos de diferentes níveis de déficit hídrico na fotossíntese e condutância foliar em milho. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 53-62, 2003.
- POSMYK, M.M.; JANAS, K.M. Melatonin in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2009.
- REN, H.; WEI, K.F.; JIA, W.S.; DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Modulation of root signals in relation to stomatal sensitivity to root-sourced ABA in droughted plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 49, n. 10, p. 1413-1421, 2007.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. 1. ed. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 25 p.
- ROSA, L.M.; DILLENBURG, L.R.; RORSETH, I.N. Response of soybean leaf angle, photosynthesis and stomatal conductance to leaf and soil water potential. **Annals of Botany**, London, v. 67, p. 51-58, 1991.
- ROSHCHINA, V.V. **Biomediators in plants: acetylcholine and biogenic amines**. Pushchino: Biological Center of USSR Academy of Science, 1991. 192 p.
- _____. Mechanisms of cell-cell communication. In: NARWAL, S.S. (Ed.). **Allelopathy update**. New Hampshire: Science Publishers, 1999. v. 2, p. 3-25.
- _____. **Neurotransmitters in plant life**. Enfield: Science Publishers, 2001. 283 p.
- ROSHCHINA, V.V.; ROSHCHINA, V.D. **The excretory function of higher plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. 314 p.
- ROTUNDO, R.L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. **Journal of Neurocytology**, Boston, v. 32, n. 5/8, p. 743-766, 2003.
- SAGANE, Y.; NAKAGAWA, T.; YAMAMOTO, K.; MICHIKAWA, S.; OGURI, S.; MOMONOKI, Y.S. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase. A novel enzyme family in the plant kingdom. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 138, n. 3, p. 1359-1371, 2005.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 758 p.
- SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Enrolamento e expansão das folhas de milho submetidas a déficit hídrico em diferentes solos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 1-6, 1998.

- SANTOS, M.G.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; PIMENTEL, C. Photosynthetic parameters and leaf water potential of five common bean genotypes under mild water deficit. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 53, n. 2, p. 229-236, 2009.
- SAS INSTITUTE. **SAS System: SAS/STAT**. Cary, 2003. version 9.1.
- SCHULZE, E.D. Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 37, p. 247-274, 1986.
- SCHURR, L.; GOLLAN, T.; SCHULZE, E.D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap concentration of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 561-567, 1992.
- SCHUSSLER, J.R.; WESTGATE, M.E. Maize kernel set at low water potential. I. Sensitivity to reduced assimilates during early kernel growth. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1189-195, 1991.
- SHELP, B.J.; BOWN, A.W.; McLEAN, M.D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 446-452, 1999.
- SHELP, B.J.; Van CAUWENBERGHE, O.R.; BOWN, A.W. Gamma aminobutyrate: from intellectual curiosity to practical pest control. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, n. 11, p. 1045-1048, 2003.
- SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase - New roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.
- STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1531-1542, 2000.
- ŚWIĘDRYCH, A.; LORENC-KUKUŁA, K.; SKIRYCZ, A.; SZOPA, J. The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 7/8, p. 593-600, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.
- TANADA, T. On the involvement of acetylcholine in phytochrome action. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 49, n. 5, p. 860-861, 1972.
- TAPKEN, D.; HOLLMANN, M. *Arabidopsis thaliana* glutamate receptor ion channel function demonstrated by ion pore transplantation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 383, n. 1, p. 36-48, 2008.
- TRETYN, A. Influence of red light and acetylcholine on $^{43}\text{Ca}^{2+}$ uptake by oat coleoptile cells. **Cell Biology International Reports**, London, v. 11, n. 12, p. 887-896, 1987.

TRETYN, A.; KENDRICK, R.E. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action. **Botanical Review**, Bronx, v. 57, n. 1, p. 33-73, 1991.

_____. Induction of leaf unrolling by phytochrome and acetylcholine in etiolated wheat seedlings. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 123-129, 1990.

TRETYN, A.; TRETYN, M. Diurnal acetylcholine oscillation in green oat seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 10, n. 3, p. 243-246, 1988.

TRETYN, A.; BOSSEN, M.E.; KENDRICK, R.E. The influence of acetylcholine on the swelling of wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 136, n. 1, p. 24-29, 1990.

TRETYN, A.; KOPCEWICZ, J.; ŚLESIAK, E. Interaction of light and the cholinergic system in the regulation of seed germination. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 30, n. 5, p. 338-342, 1988.

TRETYN, A.; ŁUKASIEWICZ-RUTKOWSKA, H.; KOPCEWICZ, J. Isolation, purification and identification of acetylcholine in *Pharbitis nil* seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 19, n. 3, p. 303-309, 1997.

TRETYN, A.; ŚLESIAK, E.; ANDERSZ, A. Interaction of light and the cholinergic system in the process of seed germination. In: LIGHT AND HORMONAL INTERACTIONS OF PLANTS SYMPOSIUM, 1985, Berlin. **Abstracts...** Berlin: Humboldt University, 1985. p. 93-94.

TRETYN, A.; ŚLESIAK, E.; KWIATKOWSKA, K. Cytochemical localization of AChE in plant cells in LM/TEM/SEM. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Bialystok, v. 24, n. 4, p. 328-329, 1986.

TRETYN, A.; BOBKIEWICZ, W.; TRETYN, M.; MIEHALSKI, L. The identification of acetylcholine and choline in oat seedlings by gas chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Wrocław, v. 56, n. 3, p. 499-511, 1987.

TRETYN, A.; KENDRICK, R.E.; BOSSEN, M.E.; VREDENBERG, W.J. Influence of acetylcholine agonists and antagonists on the swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) mesophyll protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 182, n. 4, p. 473-479, 1990.

TURNER, N.C. Crop water deficit: a decade of progress. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 39, p. 1-51, 1986.

_____. Stomatal behavior and water status of maize, sorghum, and tobacco under field conditions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 53, n. 3, p. 360-365, 1974.

VERBEEK, M.; VENDRIG, J.C. Are acetylcholine-like cotyledon-factors involved in the growth of the cucumber hypocotyl? **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 83, n. 4, p. 335-340, 1977.

WALCH-LIU, P.; LIU, L.H.; REMANS, T.; TESTER, M.; FORDE, B.G. Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 8, p. 1045-57, 2006.

WANG, H.; WANG, X.; LOU, C. Relationship between acetylcholine and stomatal movement in *Vicia faba*. **Acta Botanica Sinica**, Beijing, v. 41, n. 2, p. 171-175, 1999.

WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, S.; LOU, C. Muscarinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating of stomatal function. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 45, n. 3, p. 250-252, 2000.

WANG, H.; ZHANG, S.; WANG, X.; LOU, C. Involvement of Ca^{2+} /CaM in the signal transduction of acetylcholine-regulating stomatal movement. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 48, n. 4, p. 351-354, 2003.

_____. Nicotinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating of stomatal movement. **Science in China**, Beijing, v. 41, n. 6, p. 650-656, 1998.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C.J.; RACKÉ, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule widely distributed in biological system: expression and function in humans. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 59-79, 1998.

_____. The cholinergic "pitfall": Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Carlton, v. 26, n. 3, p. 198-205, 1999.

WESSLER, I.; KILBINGER, H.; BITTINGER, F.; KIRKPATRICK, C.J. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. **The Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 85, n. 1, p. 2-10, 2001.

WILKINSON S. pH as a stress signal. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 29, n. 1/2, p. 87-99, 1999.

WILLMER, C.M.; PETROPOULOU, Y.; MANETAS, Y. No light activation and high malate sensitivity of phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cell protoplasts of *Commelina communis* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 283-294, 1990.

WIPF, D.; LUDEWIG, U.; TEGEDER, M.; RENTSCH, D.; KOCH, W.; FROMMER, W.B. Amino acid/neurotransmitter transporters are highly conserved between fungi, plants and animals. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 139-147, 2002.

WIŚNIEWSKA, J.; TRETYN, A. Acetylcholinesterase activity in *Lycopersicon esculentum* and its phytochrome mutants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 711-717, 2003.

_____. The effect of light on the level of acetylcholine in seedlings of the wild-type and phytochrome mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracovia, v. 21, n. 3, p. 221-230, 1999.

YAMAMOTO, K.; OGURI, S.; MOMONOKI, Y.S. Characterization of trimeric acetylcholinesterase from a legume plant, *Macroptilium atropurpureum* Urb. **Planta**, Berlin, v. 227, n. 4, p. 809-822, 2008.

YAMAMOTO, K.; SAKAMOTO, H.; MOMONOKI, Y.S. Maize acetylcholinesterase is a positive regulator of heat tolerance in plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 16, p. 1987-1992, 2011.

YAMAMOTO, K.; OGURI, S.; CHIBA, S.; MOMONOKI, Y.S. Molecular cloning of acetylcholinesterase gene from *Salicornia europaea* L. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 4, n. 5, p. 361-366, 2009.

ZHANG, J.; DAVIES, W.J. Absciscic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 73-81, 1989.

_____. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status com account for changes in leaf conductance and growth. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 271-285, 1990.

ZINSELMEIER, C.; WESTGATE, M.E.; JONES, R.J. Kernel set at low water potential does not vary with source sink/ratio in maize. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 1, p.158-164, 1995.

ANEXOS

Anexo A

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	4.203	4.175	4.400	929225	28.63	166687	19.57	5.57	
2	5.807	5.692	5.833	631481	19.45	137429	16.14	4.59	
3	5.883	5.833	5.917	503558	15.51	147462	17.32	3.41	V
4	6.019	5.917	6.083	429718	13.24	76964	9.04	5.58	V
5	6.151	6.083	6.192	752189	23.17	323091	37.94	2.33	V
				3246171	100.00	851633	100.00		

Figura 3 - Cromatograma do padrão externo (cloreto de acetilcolina), identificando 2-(dimetilamino)etil éster no pico 3 (seta).

Anexo B

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.702	3.675	3.808	118739	4.75	33615	5.35	3.53		Acetic anhydride
2	3.831	3.808	3.967	17038	0.68	7582	1.21	2.25		Methanesulfonyl chloride
3	4.204	4.167	4.275	17445	0.70	8179	1.30	2.13		Thiocyanic acid, methyl ester
4	4.308	4.283	4.375	2438	0.10	1872	0.30	1.30		Ethyl N-hydroxyacetimidate
5	4.550	4.508	4.608	18317	0.73	6573	1.05	2.79		3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecane, 2,2,1
6	4.667	4.608	4.733	9645	0.39	2850	0.45	3.38	V	O-Ethyl-O'-(trimethyl)silyl methylphos
7	4.950	4.908	4.992	9617	0.38	2235	0.36	4.30		.alpha.-Methylstyrene
8	5.032	4.992	5.100	22558	0.90	4643	0.74	4.86	V	1-Dodecanol
9	5.117	5.100	5.142	6571	0.26	3030	0.48	2.17	V	Pentanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester
10	5.178	5.142	5.208	20651	0.83	6604	1.05	3.13	V	.alpha.-Methylstyrene
11	5.224	5.208	5.258	15703	0.63	6165	0.98	2.55	V	Benzene, 2-ethenyl-1,4-dimethyl-
12	5.292	5.258	5.325	24113	0.96	6307	1.00	3.82	V	.alpha.-Methylstyrene
13	5.342	5.325	5.358	16401	0.66	8298	1.32	1.98	V	.alpha.-Methylstyrene
14	5.441	5.358	5.533	76159	3.04	11063	1.76	6.88	V	.alpha.-Methylstyrene
15	5.758	5.717	5.800	3844	0.15	1290	0.21	2.98		Propanoic acid, 3-phenoxy-, methyl est
16	5.878	5.800	5.908	15625	0.62	5079	0.81	3.08		Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) est
17	5.958	5.908	6.000	22052	0.88	8111	1.29	2.72	V	1-Tetradecene
18	6.050	6.000	6.083	35875	1.43	24874	3.96	1.44	V	Acetic acid
19	6.154	6.092	6.183	125594	5.02	58564	9.33	2.14		Furfural
20	6.247	6.183	6.317	272602	10.90	40321	6.42	6.76	V	Diphenylmethane
21	6.443	6.317	6.567	324846	12.98	32986	5.25	9.85	V	Phenol
22	6.704	6.625	6.850	888991	35.53	222350	35.41	4.00		Formic acid
23	6.936	6.892	6.950	8418	0.34	4108	0.65	2.05		Tris(trimethylsilyl)borate
24	7.018	6.967	7.033	52853	2.11	22594	3.60	2.34		2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
25	7.103	7.033	7.125	172825	6.91	46455	7.40	3.72	V	2-Cyclopentene-1,4-dione
26	7.161	7.125	7.242	178420	7.13	44041	7.01	4.05	V	Benzenethiol, 3-methyl-
27	7.267	7.242	7.317	24578	0.98	8159	1.30	3.01	V	Dodecanoic acid, propyl ester

Figura 4 – Planta 1 hidratada, folha 7

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	3.482	3.367	3.600	198678	2.39	28517	0.91	6.97	
2	4.007	3.942	4.083	88995	1.07	21014	0.67	4.24	
3	4.177	4.083	4.358	938702	11.27	179745	5.73	5.22	V
4	4.383	4.358	4.433	52847	0.63	23665	0.75	2.23	V
5	4.578	4.433	4.650	46557	0.56	19650	0.63	2.37	V
6	4.698	4.667	4.742	138465	1.66	83489	2.66	1.66	
7	4.964	4.933	5.000	58463	0.70	37181	1.19	1.57	
8	5.455	5.425	5.492	20558	0.25	12122	0.39	1.70	
9	5.781	5.750	5.808	20589	0.25	13184	0.42	1.56	
10	5.875	5.833	5.967	43323	0.52	13290	0.42	3.26	
11	5.995	5.967	6.033	28075	0.34	11485	0.37	2.44	V
12	6.158	6.125	6.183	112072	1.35	79463	2.53	1.41	
13	6.266	6.183	6.292	240724	2.89	177235	5.65	1.36	V
14	6.596	6.492	6.683	688571	8.27	161233	5.14	4.27	
15	6.709	6.683	6.733	104128	1.25	56909	1.82	1.83	V
16	6.816	6.733	6.908	1229585	14.76	371201	11.84	3.31	V
17	7.034	6.992	7.092	130914	1.57	42535	1.36	3.08	
18	7.214	7.092	7.300	3761309	45.16	1617370	51.59	2.33	V
19	7.326	7.300	7.367	329224	3.95	152048	4.85	2.17	V
20	7.397	7.367	7.425	97212	1.17	33668	1.07	2.89	V
				8328991	100.00	3135004	100.00		

Figura 5 – Planta 1 sob estresse, folha 4

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.247	3.225	3.275	2643	0.08	1283	0.22	2.06		Thiirane, methyl-
2	3.383	3.275	3.400	6784	0.21	884	0.15	7.67	V	Trimethylolpropane phosphite
3	4.517	4.458	4.608	33186	1.01	4207	0.72	7.89		.alpha.-Methylstyrene
4	4.633	4.608	4.650	17595	0.54	7434	1.28	2.37	V	Hexanoic acid, butyl ester
5	4.817	4.650	4.875	221378	6.74	21226	3.64	10.43	V	Benzonitrile, 4-methyl-
6	4.892	4.875	4.933	55234	1.68	16915	2.90	3.27	V	(3-Oxo-2-pent-2-enylcyclopentyl)aceti
7	5.067	4.933	5.100	150140	4.57	15963	2.74	9.41	V	.alpha.-Methylstyrene
8	5.124	5.100	5.150	45820	1.40	15902	2.73	2.88	V	.alpha.-Methylstyrene
9	5.183	5.150	5.217	65468	1.99	16703	2.87	3.92	V	Benzenemethanamine, 3,4-dimethyl-
10	5.233	5.217	5.317	105601	3.22	17185	2.95	6.14	V	.alpha.-Methylstyrene
11	5.351	5.317	5.367	56289	1.71	19502	3.35	2.89	V	Cyclopentanethiol
12	5.439	5.367	5.542	150756	4.59	19994	3.43	7.54	V	.alpha.-Methylstyrene
13	5.650	5.542	5.675	18591	0.57	1879	0.32	9.89	V	2-(2-Methyloxyryl)ethoxycarbonylmetl
14	5.716	5.675	5.800	12448	0.38	3154	0.54	3.95	V	4-Hydroxybutyl acrylate
15	5.936	5.825	5.975	60179	1.83	11422	1.96	5.27		Acetic acid
16	6.075	5.975	6.092	22470	0.68	1589	0.27	14.14	V	Propyl 2-ethylhexanoate
17	6.288	6.092	6.408	774408	23.59	144383	24.77	5.36		Acetamide
18	6.508	6.408	6.550	194885	5.94	25087	4.30	7.77	V	Phenol
19	6.575	6.550	6.633	56974	1.74	21715	3.73	2.62	V	Formic acid
20	6.770	6.633	6.800	22568	0.69	4518	0.78	5.00		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
21	6.861	6.800	6.908	239957	7.31	82235	14.11	2.92		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
22	7.066	6.908	7.158	824900	25.13	99076	17.00	8.33	V	Butanedinitrile
23	7.205	7.158	7.233	69798	2.13	15549	2.67	4.49	V	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan
24	7.318	7.233	7.358	55737	1.70	10338	1.77	5.39	V	Phenol, 4-methyl-
25	7.448	7.392	7.458	18488	0.56	4796	0.82	3.85		1-Octadecene

Figura 6 – Planta 2 hidratada, folha 7

Figura 7 – Planta 2 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.425	3.375	3.458	61218	0.92	16728	0.70	3.66		1H-Pyrrole, 1-methyl-
2	3.509	3.458	3.675	188366	2.82	30611	1.28	6.15	V	p-Xylene
3	4.019	3.942	4.092	107899	1.62	36256	1.52	2.98		D-Limonene
4	4.194	4.167	4.367	701178	10.50	151288	6.33	4.63		Cyclobutylamine
5	4.582	4.542	4.650	56577	0.85	20944	0.88	2.70		Styrene
6	4.706	4.650	4.750	45518	0.68	23677	0.99	1.92	V	Methane, isothiocyanato-
7	5.458	5.425	5.550	19288	0.29	8217	0.34	2.35		Benzene, 1-ethenyl-3-methyl-
8	5.700	5.675	5.875	25216	0.38	3768	0.16	6.69		Silane, chloro(1,1-dimethylethyl)dimet
9	6.160	6.100	6.183	74940	1.12	46009	1.93	1.63		Acetic acid
10	6.268	6.183	6.292	126427	1.89	88871	3.72	1.42	V	Furfural
11	6.403	6.292	6.517	613844	9.19	107166	4.49	5.73	V	Acetamide
12	6.579	6.517	6.625	131397	1.97	39062	1.64	3.36	V	Benzenethiol
13	6.644	6.625	6.675	27534	0.41	17258	0.72	1.60	V	Pyrrole
14	6.750	6.700	6.767	54925	0.82	18269	0.76	3.01		Benzaldehyde
15	6.810	6.767	6.883	379648	5.68	117259	4.91	3.24	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
16	6.992	6.883	7.050	263562	3.95	47026	1.97	5.60	V	Phenol, 4-methyl-
17	7.067	7.050	7.092	18164	0.27	11109	0.47	1.64	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
18	7.215	7.142	7.300	3288965	49.24	1421166	59.49	2.31		Benzenethiol, 3-methyl-
19	7.328	7.300	7.358	261381	3.91	128089	5.36	2.04	V	Benzonitrile
20	7.428	7.358	7.458	233407	3.49	56104	2.35	4.16	V	m-Tolyl isothiocyanate
				6679454	100.00	2388877	100.00			

Figura 8 – Planta 3 hidratada, folha 7

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	3.350	3.317	3.400	182063	0.27	84443	0.32	2.16	
2	3.856	3.817	3.900	242163	0.35	107524	0.41	2.25	
3	3.956	3.900	4.075	14065790	20.59	5942024	22.43	2.37	
4	4.100	4.075	4.125	95772	0.14	46400	0.18	2.06	
5	4.152	4.125	4.317	1911663	2.80	361867	1.37	5.28	V
6	4.357	4.317	4.458	2558300	3.74	888083	3.35	2.88	
7	4.679	4.608	4.775	20481290	29.98	8863137	33.45	2.31	
8	4.833	4.775	4.875	194660	0.28	74424	0.28	2.62	V
9	5.226	5.183	5.267	269389	0.39	150291	0.57	1.79	
10	5.447	5.417	5.533	175698	0.26	84064	0.32	2.09	
11	5.650	5.617	5.683	186543	0.27	110620	0.42	1.69	
12	5.721	5.683	5.767	146767	0.21	63266	0.24	2.32	V
13	5.908	5.867	5.975	518045	0.76	249111	0.94	2.08	
14	6.152	6.083	6.217	5953624	8.71	3579904	13.51	1.66	
15	6.598	6.550	6.625	690848	1.01	231312	0.87	2.99	
16	6.642	6.625	6.683	537090	0.79	199999	0.75	2.69	V
17	6.711	6.683	6.783	1009855	1.48	316574	1.19	3.19	V
18	6.904	6.850	6.958	675577	0.99	230597	0.87	2.93	
19	7.158	7.133	7.183	59141	0.09	28309	0.11	2.09	
20	7.223	7.183	7.458	18364236	26.88	4884776	18.44	3.76	V
				68318514	100.00	26496725	100.00		

Figura 9 – Planta 3 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.425	3.375	3.592	206572	1.87	36707	0.83	5.63	V	p-Xylene
2	3.880	3.833	3.942	27575	0.25	8459	0.19	3.26		p-Xylene
3	4.016	3.942	4.083	102220	0.93	33262	0.76	3.07	V	D-Limonene
4	4.146	4.083	4.225	946527	8.57	218909	4.97	4.32	V	Acetic acid ethenyl ester
5	4.244	4.225	4.358	341792	3.09	119476	2.71	2.86	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
6	4.385	4.358	4.433	53432	0.48	29774	0.68	1.79	V	Methane, isothiocyanato-
7	4.587	4.433	4.650	39986	0.36	11062	0.25	3.61	V	Styrene
8	4.702	4.650	4.750	359463	3.25	192145	4.36	1.87	V	Thiocyanic acid, methyl ester
9	4.856	4.750	4.933	179442	1.62	33892	0.77	5.29	V	Thiocyanic acid, ethyl ester
10	4.966	4.933	5.000	35358	0.32	14769	0.34	2.39	V	2-Propanone, 1-hydroxy-
11	5.061	5.000	5.092	42080	0.38	12021	0.27	3.50	V	1-Decanol, 2-hexyl-
12	5.117	5.092	5.167	28750	0.26	8289	0.19	3.47	V	Pentanoic acid, 3-methyl-
13	5.192	5.167	5.267	49166	0.44	10751	0.24	4.57	V	1-Hexadecanol, 3,7,11,15-tetramethyl-
14	5.290	5.267	5.325	32019	0.29	11402	0.26	2.81	V	3-Octanol, 3,7-dimethyl-
15	5.460	5.325	5.533	113319	1.03	18786	0.43	6.03	V	alpha-Methylstyrene
16	5.642	5.533	5.667	31325	0.28	3633	0.08	8.62	V	Benzene, 1,3,5-trimethyl-
17	5.902	5.867	5.917	34581	0.31	17141	0.39	2.02	V	Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) est
18	6.158	6.108	6.183	112757	1.02	74330	1.69	1.52		Acetic acid
19	6.267	6.183	6.292	268399	2.43	149904	3.40	1.79	V	Furfural
20	6.315	6.292	6.350	78268	0.71	29104	0.66	2.69	V	2-Piperidinecarboxylic acid, (+/-)-
21	6.460	6.350	6.533	618397	5.60	118440	2.69	5.22	V	Acetamide
22	6.570	6.533	6.625	542147	4.91	203898	4.63	2.66	V	Benzenethiol
23	6.642	6.625	6.675	65465	0.59	37983	0.86	1.72	V	Pyrrole
24	6.698	6.675	6.717	96040	0.87	58575	1.33	1.64	V	Formic acid
25	6.742	6.717	6.775	132022	1.19	82666	1.88	1.60	V	Benzaldehyde
26	6.866	6.817	6.917	115639	1.05	38398	0.87	3.01		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
27	7.069	6.975	7.092	72272	0.65	19760	0.45	3.66		Phenol, 3-methyl-
28	7.211	7.092	7.300	5798713	52.48	2553977	57.98	2.27	V	Benzenethiol, 3-methyl-
29	7.324	7.300	7.367	459158	4.16	244212	5.54	1.88	V	Benzonitrile

Figura 10 – Planta 4 hidratada, folha 7

Figura 11 – Planta 4 sob estresse, folha 7

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.466	3.317	3.642	880331	3.89	141478	1.54	6.22		p-Xylene
2	4.016	3.942	4.092	138863	0.61	54404	0.59	2.55		D-Limonene
3	4.161	4.100	4.225	648477	2.87	172166	1.88	3.77		Acetic anhydride
4	4.245	4.225	4.333	287008	1.27	109297	1.19	2.63	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
5	4.386	4.333	4.450	92512	0.41	44125	0.48	2.10	V	Methane, isothiocyanato-
6	4.581	4.542	4.658	131899	0.58	50708	0.55	2.60		Styrene
7	4.702	4.667	4.792	1092099	4.83	587238	6.40	1.86		Thiocyanic acid, methyl ester
8	4.966	4.942	5.000	10680	0.05	7794	0.08	1.37		2-Propanone, 1-hydroxy-
9	5.251	5.217	5.325	38236	0.17	21367	0.23	1.79		Formamide, N,N-dimethyl-
10	5.458	5.425	5.550	49882	0.22	20693	0.23	2.41		2,6-Nonadienal, (E,E)-
11	5.603	5.575	5.642	13575	0.06	7213	0.08	1.88		1-Hexadecene
12	5.718	5.683	5.775	78490	0.35	43102	0.47	1.82		Acetic acid
13	5.818	5.775	5.850	131779	0.58	72162	0.79	1.83		Furfural
14	5.892	5.850	5.917	68625	0.30	18759	0.20	3.66	V	2-Butenedioic acid (Z)-, bis(trimethylsilyl)-
15	5.943	5.917	6.025	87883	0.39	30894	0.34	2.84	V	Acetamide, N,N-dimethyl-
16	6.081	6.033	6.108	21007	0.09	9853	0.11	2.13		4-Ethylcyclohexanol
17	6.159	6.117	6.183	207851	0.92	135656	1.48	1.53		Acetic acid
18	6.225	6.183	6.242	184957	0.82	65354	0.71	2.83	V	Pyridine
19	6.266	6.242	6.292	337437	1.49	191727	2.09	1.76	V	Furfural
20	6.338	6.292	6.442	263087	1.16	55943	0.61	4.70	V	1-Hexyne
21	6.571	6.442	6.675	4505031	19.91	1691463	18.44	2.66	V	Benzenethiol
22	6.696	6.675	6.717	239025	1.06	121069	1.32	1.97	V	Formic acid
23	6.746	6.717	6.808	659319	2.91	349643	3.81	1.89	V	Benzaldehyde
24	6.843	6.808	6.900	176540	0.78	75420	0.82	2.34	V	Pyridine, 3-methyl-
25	6.936	6.908	6.958	36776	0.16	23271	0.25	1.58		2-Cyclopentene-1,4-dione
26	6.998	6.958	7.050	957698	4.23	416829	4.55	2.30		Benzenethiol, 3-methyl-
27	7.066	7.050	7.092	85619	0.38	58359	0.64	1.47	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
28	7.158	7.092	7.175	1075191	4.75	388510	4.24	2.77		Benzenethanamine, 2-methoxy-N, alpi
29	7.215	7.175	7.308	9382697	41.46	4013270	43.76	2.34	V	Benzenethiol, 3-methyl-
30	7.351	7.308	7.425	746156	3.30	193334	2.11	3.86	V	Trimethylamine
				22628730	100.00	9171101	100.00			

Figura 12 – Planta 5 hidratada, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.358	3.317	3.383	88802	0.38	32552	0.40	2.73		p-Xylene
2	3.431	3.383	3.592	955970	4.05	161625	1.98	5.91	V	p-Xylene
3	3.874	3.833	3.908	42035	0.18	21902	0.27	1.92		p-Xylene
4	3.975	3.908	3.992	88992	0.38	30378	0.37	2.93	V	Borane, triethyl-
5	4.015	3.992	4.075	125544	0.53	42507	0.52	2.95	V	Limonene
6	4.110	4.075	4.317	1655840	7.02	305298	3.74	5.42	V	Acetic anhydride
7	4.384	4.317	4.450	467713	1.98	221843	2.72	2.11	V	Methane, isothiocyanato-
8	4.701	4.608	4.783	2117401	8.98	1056501	12.95	2.00		Thiocyanic acid, methyl ester
9	4.894	4.783	4.908	739857	3.14	213735	2.62	3.45	MI	1,2-Ethanediamine, N,N,N',N'-tetramet
10	4.917	4.908	5.025	1294068	5.49	202852	2.49	6.37	MI	Bicine
11	5.188	5.025	5.225	1833416	7.77	157408	1.93	11.65	V	1,2-Ethanediamine, N,N,N',N'-tetramet
12	5.241	5.225	5.308	306088	1.30	144860	1.78	2.11	V	Formamide, N,N-dimethyl-
13	5.337	5.308	5.375	121518	0.52	73745	0.90	1.65	V	Pyridine, 3-methyl-
14	5.454	5.417	5.500	202385	0.86	81991	1.01	2.47		1-Propanamine, 2-chloro-N,N-dimethyl-
15	5.607	5.500	5.642	146196	0.62	24479	0.30	5.97	V	Pyrazine, methyl-
16	5.910	5.875	5.942	89429	0.38	46403	0.57	1.93		Acetamide, N,N-dimethyl-
17	6.000	5.942	6.058	169700	0.72	35525	0.44	4.78	V	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl-
18	6.081	6.058	6.125	105118	0.45	37776	0.46	2.78	V	Methanaminium, 1-carboxy-N,N,N-tri-
19	6.159	6.125	6.183	361126	1.53	199461	2.45	1.81	V	Acetic acid
20	6.200	6.183	6.242	213480	0.91	91021	1.12	2.35	V	Propanediamide
21	6.266	6.242	6.292	261207	1.11	180396	2.21	1.45	V	Furfural
22	6.358	6.292	6.442	125032	0.53	20408	0.25	6.13		Benzeneacetic acid, alpha-phenyl-, 2-(
23	6.513	6.442	6.542	155269	0.66	37973	0.47	4.09	V	Propanedinitrile, (ethoxymethylene)-
24	6.575	6.542	6.667	1154897	4.90	402717	4.94	2.87	V	Benzenethiol
25	6.694	6.667	6.717	122106	0.52	57413	0.70	2.13	V	Formic acid
26	6.747	6.717	6.800	418273	1.77	230060	2.82	1.82	V	Benzaldehyde
27	6.867	6.800	6.975	1233725	5.23	388438	4.76	3.18		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
28	7.069	7.042	7.092	49792	0.21	32497	0.40	1.53		2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
29	7.216	7.133	7.308	8471339	35.92	3392214	41.58	2.50		Benzenethiol, 3-methyl-
30	7.325	7.308	7.400	468207	1.99	233375	2.86	2.01	V	Benzonitrile
				23584525	100.00	8157353	100.00			

Figura 13 – Planta 5 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	4.018	3.950	4.117	153034	2.04	51039	2.02	3.00		D-Limonene
2	4.145	4.117	4.325	779836	10.39	174103	6.90	4.48		Acetic acid ethenyl ester
3	4.580	4.542	4.633	48769	0.65	19074	0.76	2.56		Styrene
4	4.708	4.633	4.925	121707	1.62	12804	0.51	9.51	V	Methane, isothiocyanato-
5	4.965	4.925	5.058	108963	1.45	30103	1.19	3.62	V	Benzeneacetonitrile, alpha.-acetyl-
6	5.747	5.717	5.808	22329	0.30	10136	0.40	2.20		Phenol, 4-amino-
7	5.904	5.875	5.942	15679	0.21	8401	0.33	1.87		Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) est
8	6.081	6.025	6.100	28558	0.38	12944	0.51	2.21		6-Tridecene, (Z)-
9	6.189	6.100	6.242	1150619	15.33	342940	13.59	3.36	V	Acetamide
10	6.269	6.242	6.292	267657	3.57	128375	5.09	2.08	V	Furfural
11	6.320	6.292	6.367	378842	5.05	89724	3.56	4.22	V	2-Nonyne
12	6.469	6.367	6.542	1018345	13.57	131529	5.21	7.74	V	2-Pyrimidinamine
13	6.567	6.542	6.617	236725	3.15	75396	2.99	3.14	V	Propanoic acid, 3-(phenylthio)-
14	6.644	6.617	6.675	125108	1.67	78733	3.12	1.59	V	Pyrrrole
15	6.746	6.717	6.775	46515	0.62	21517	0.85	2.16		Benzaldehyde
16	6.916	6.775	6.975	487957	6.50	172618	6.84	2.83	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
17	7.155	7.083	7.175	76334	1.02	15418	0.61	4.95		Phenol, 4-methyl-
18	7.214	7.175	7.258	1956433	26.07	900496	35.70	2.17		Benzenethiol, 3-methyl-
19	7.276	7.258	7.300	238851	3.18	127785	5.07	1.87	V	Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.327	7.300	7.375	243219	3.24	119561	4.74	2.03	V	Benzonitrile
				7505480	100.00	2522696	100.00			

Figura 14 – Folha 6 hidratada, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.427	3.383	3.483	57404	0.85	16639	0.75	3.45	V	p-Xylene
2	3.517	3.483	3.583	22279	0.33	7219	0.33	3.09	V	1-Butanol
3	4.017	3.950	4.075	99027	1.46	34612	1.56	2.86		D-Limonene
4	4.167	4.075	4.217	358476	5.30	119094	5.38	3.01	V	Acetic anhydride
5	4.244	4.217	4.325	224121	3.32	92735	4.19	2.42	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
6	4.593	4.542	4.658	516135	7.63	170020	7.68	3.04		Styrene
7	4.824	4.658	4.942	154847	2.29	14916	0.67	10.38	V	Bi-2,4,6-cycloheptatrien-1-yl
8	5.248	5.208	5.317	32908	0.49	13727	0.62	2.40		.alpha.-Methylstyrene
9	5.742	5.667	5.800	21256	0.31	5609	0.25	3.79	V	Cyclohexanone, 4-methyl-
10	6.156	6.025	6.217	372013	5.50	113568	5.13	3.28		Acetamide
11	6.267	6.225	6.292	136409	2.02	81432	3.68	1.68		Furfural
12	6.387	6.292	6.442	380752	5.63	55761	2.52	6.83	V	Diphenylmethane
13	6.579	6.442	6.625	721876	10.68	106786	4.82	6.76	V	Phenol
14	6.641	6.625	6.675	110510	1.63	68846	3.11	1.61	V	Pyrrrole
15	6.742	6.675	6.767	27693	0.41	14815	0.67	1.87	V	Benzaldehyde
16	6.860	6.800	6.917	419785	6.21	142200	6.42	2.95		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
17	6.942	6.917	6.967	32178	0.48	12102	0.55	2.66	V	Propanedioic acid, [(trimethylsilyl)oxy]
18	6.992	6.967	7.033	24976	0.37	8808	0.40	2.84	V	Butanoic acid, phenyl ester
19	7.213	7.092	7.300	2717594	40.20	1014501	45.82	2.68		Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.326	7.300	7.400	330164	4.88	120508	5.44	2.74	V	Benzonitrile
				6760403	100.00	2213898	100.00			

Figura 15 – Planta 6 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC														
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name				
1	3.527	3.375	3.667	642922	3.60	81535	1.08	7.89		p-Xylene				
2	4.015	3.975	4.050	115908	0.65	55694	0.74	2.08		D-Limonene				
3	4.101	4.050	4.217	1569194	8.78	396049	5.24	3.96	V	Acetic anhydride				
4	4.244	4.217	4.325	370873	2.07	157964	2.09	2.35	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-				
5	4.385	4.325	4.433	51834	0.29	22845	0.30	2.27	V	Methane, isothiocyanato-				
6	4.581	4.533	4.667	323067	1.81	118196	1.56	2.73		Styrene				
7	4.703	4.667	4.767	315093	1.76	158923	2.10	1.98	V	Thiocyanic acid, methyl ester				
8	6.151	6.108	6.183	186234	1.04	119334	1.58	1.56		Acetic acid				
9	6.265	6.225	6.392	1578518	8.83	619161	8.18	2.55		Formic acid				
10	6.578	6.542	6.608	243400	1.36	98926	1.31	2.46		Benzenethiol				
11	6.638	6.608	6.708	1186229	6.64	491768	6.50	2.41	V	Formic acid				
12	6.751	6.717	6.783	61062	0.34	33974	0.45	1.80		Benzaldehyde				
13	7.062	7.033	7.092	69971	0.39	35331	0.47	1.98	V	2-Tetradecanol				
14	7.210	7.175	7.425	11054391	61.84	5085739	67.23	2.17	SV	Benzenethiol, 3-methyl-				
15	7.326	7.308	7.358	108391	0.61	89252	1.18	1.21	T	Benzonitrile				
				17877087	100.00	7564691	100.00							

Figura 16 – Planta 7 hidratada, folha 7

Figura 17 – Planta 7 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.389	3.358	3.408	72294	0.35	32842	0.62	2.20		1H-Pyrrole, 1-methyl-
2	3.460	3.408	3.592	345612	1.67	68695	1.29	5.03	V	p-Xylene
3	3.857	3.800	3.917	177640	0.86	76159	1.43	2.33		Pyridine
4	3.991	3.917	4.100	452198	2.18	105266	1.98	4.30	V	D-Limonene
5	4.194	4.150	4.208	444500	2.15	225239	4.24	1.97		Cyclobutylamine
6	4.222	4.208	4.350	829207	4.00	219832	4.14	3.77	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
7	4.381	4.350	4.425	80444	0.39	32462	0.61	2.48	V	1H-Pyrazole, 4,5-dihydro-3-methyl-
8	4.542	4.467	4.600	174776	0.84	66092	1.25	2.64		Pyridine, 2,6-dimethyl-
9	4.692	4.667	4.783	175394	0.85	52767	0.99	3.32		Thiocyanic acid, methyl ester
10	4.993	4.867	5.125	615162	2.97	86122	1.62	7.14	V	2-Butenedinitrile, (E)-
11	5.226	5.125	5.258	608624	2.94	160347	3.02	3.80		Formamide, N,N-dimethyl-
12	5.275	5.258	5.300	225992	1.09	92827	1.75	2.43	V	2-Phenylpropyl isobutyrate
13	5.447	5.300	5.542	1068798	5.16	93651	1.76	11.41	V	.alpha.-Methylstyrene
14	5.592	5.542	5.617	157430	0.76	38110	0.72	4.13	V	Pyridine, 2,4,6-trimethyl-
15	5.718	5.617	5.792	335948	1.62	52802	0.99	6.36	V	Nonanal
16	5.899	5.792	5.975	828609	4.00	133450	2.51	6.21	V	1-Heptadecanamine
17	6.151	5.975	6.233	4975699	24.03	928550	17.49	5.36	V	Ethanimidic acid, ethyl ester
18	6.261	6.233	6.292	332412	1.61	221673	4.18	1.50		Furfural
19	6.313	6.292	6.350	75976	0.37	29576	0.56	2.57	V	N-.beta.-Hydroxyethylpyrrolidine
20	6.448	6.408	6.483	102493	0.49	31463	0.59	3.26	V	Heptane, 2,2,3,3,5,6,6-heptamethyl-
21	6.525	6.483	6.558	110896	0.54	46956	0.88	2.36	V	2-Undecanol
22	6.596	6.558	6.617	210430	1.02	85786	1.62	2.45	V	Ethanone, 1-(2-furanyl)-
23	6.640	6.617	6.683	254861	1.23	101326	1.91	2.52	V	Pyrrrole
24	6.726	6.683	6.775	940530	4.54	336038	6.33	2.80	V	Benzoylformic acid
25	6.805	6.775	6.850	189663	0.92	76175	1.43	2.49	V	Undecanal, 2-methyl-
26	6.903	6.850	6.975	1032512	4.99	322610	6.08	3.20		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
27	7.071	7.017	7.133	629660	3.04	180701	3.40	3.48		Benzedrex
28	7.160	7.133	7.175	81368	0.39	45489	0.86	1.79		2-Cyclopentene-1,4-dione
29	7.232	7.175	7.375	5045923	24.36	1285972	24.22	3.92	V	Benzenethiol, 3-methyl-
30	7.392	7.375	7.425	135343	0.65	79496	1.50	1.70	V	2-(2-Hexyloxyethoxy)ethanol
				20710394	100.00	5308474	100.00			

Figura 18 – Planta 8 hidratada, folha 7

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	3.463	3.375	3.583	1120058	3.21	240136	1.67	4.66	
2	4.076	4.050	4.233	2200567	6.31	539383	3.75	4.08	
3	4.699	4.658	4.775	498091	1.43	244388	1.70	2.04	
4	4.958	4.908	5.083	326595	0.94	69789	0.49	4.68	
5	5.181	5.125	5.217	471990	1.35	110480	0.77	4.27	
6	5.450	5.358	5.517	900310	2.58	130213	0.91	6.91	
7	5.545	5.517	5.633	899422	2.58	302090	2.10	2.98	V
8	5.906	5.858	5.933	212559	0.61	73920	0.51	2.88	
9	6.154	6.125	6.183	200371	0.57	133749	0.93	1.50	
10	6.265	6.183	6.300	1810090	5.19	938101	6.52	1.93	
11	6.317	6.300	6.358	144767	0.42	84942	0.59	1.70	V
12	6.567	6.525	6.642	4216302	12.10	1861744	12.95	2.26	
13	6.667	6.642	6.708	550668	1.58	205727	1.43	2.68	V
14	6.745	6.708	6.792	1175819	3.37	558570	3.88	2.11	V
15	6.904	6.792	6.967	2448700	7.03	631378	4.39	3.88	V
16	6.994	6.967	7.050	996456	2.86	307768	2.14	3.24	
17	7.067	7.050	7.100	200910	0.58	139287	0.97	1.44	V
18	7.158	7.133	7.175	92945	0.27	50793	0.35	1.83	
19	7.210	7.175	7.375	16213635	46.52	7628482	53.05	2.13	SV
20	7.324	7.300	7.358	171048	0.49	129981	0.90	1.32	T
				34851303	100.00	14380921	100.00		

Figura 19 – Planta 8 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.461	3.383	3.592	421350	1.59	75289	0.82	5.60		p-Xylene
2	4.093	4.067	4.217	1832274	6.91	449955	4.91	4.07	V	Acetic acid ethenyl ester
3	4.244	4.217	4.317	407243	1.54	184455	2.01	2.21	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
4	4.701	4.650	4.792	536931	2.03	273998	2.99	1.96	V	Thiocyanic acid, methyl ester
5	5.007	4.983	5.075	217412	0.82	73392	0.80	2.96	V	Pyridine
6	5.550	5.525	5.608	792744	2.99	174198	1.90	4.55		Trimethylamine
7	5.636	5.608	5.683	928661	3.50	231935	2.53	4.00	V	Trimethylamine
8	5.765	5.683	5.808	1355373	5.11	233972	2.55	5.79	V	1,2-Ethanediamine, N,N,N',N'-tetramet
9	5.850	5.808	6.050	1719342	6.49	173528	1.89	9.91	V	Trimethylamine
10	6.181	6.125	6.233	1772590	6.69	496458	5.42	3.57		Propanediamide
11	6.266	6.233	6.292	943755	3.56	521821	5.70	1.81	V	Furfural
12	6.310	6.292	6.342	267520	1.01	107171	1.17	2.50	V	Carbonocyanidic acid, ethyl ester
13	6.458	6.342	6.517	865989	3.27	109444	1.19	7.91	V	1,1'-Biphenyl, 2-methyl-
14	6.569	6.517	6.625	1642487	6.20	530404	5.79	3.10	V	Benzenethiol
15	6.675	6.625	6.700	652968	2.46	153074	1.67	4.27	V	Formic acid
16	6.743	6.700	6.783	595873	2.25	209428	2.29	2.85	V	Benzaldehyde
17	6.906	6.783	6.958	824962	3.11	188676	2.06	4.37	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
18	7.067	6.958	7.092	249879	0.94	48727	0.53	5.13	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
19	7.210	7.167	7.300	9827816	37.08	4606514	50.29	2.13		Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.324	7.300	7.375	651261	2.46	317317	3.46	2.05	V	Benzonitrile
				26506430	100.00	9159756	100.00			

Figura 20 – Planta 9 hidratada, folha 7

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	3.152	3.117	3.233	140626	0.29	65607	0.27	2.14	
2	3.266	3.233	3.308	14708	0.03	7531	0.03	1.95	
3	3.471	3.317	3.700	2952120	6.12	468525	1.95	6.30	
4	3.735	3.700	3.775	72126	0.15	22231	0.09	3.24	
5	3.803	3.775	3.825	44294	0.09	15888	0.07	2.79	V
6	3.887	3.825	3.950	521645	1.08	188495	0.78	2.77	V
7	4.007	3.950	4.067	399023	0.83	123141	0.51	3.24	V
8	4.093	4.067	4.267	4719570	9.78	960993	3.99	4.91	V
9	4.291	4.267	4.342	454322	0.94	161849	0.67	2.81	V
10	4.387	4.342	4.625	4474235	9.27	1579574	6.56	2.83	SV
11	4.515	4.483	4.533	75094	0.16	43971	0.18	1.71	T
12	4.578	4.533	4.625	279443	0.58	116072	0.48	2.41	TV
13	4.700	4.625	4.775	30977453	64.19	18711690	77.75	1.66	V
14	4.852	4.775	4.908	790292	1.64	434727	1.81	1.82	V
15	4.943	4.908	4.983	114499	0.24	45504	0.19	2.52	
16	5.007	4.983	5.033	71783	0.15	29726	0.12	2.41	V
17	5.073	5.033	5.150	124321	0.26	55362	0.23	2.25	V
18	5.239	5.150	5.308	555710	1.15	229038	0.95	2.43	
19	5.327	5.308	5.358	82852	0.17	31410	0.13	2.64	V
20	5.375	5.358	5.400	58380	0.12	25308	0.11	2.31	V
21	5.455	5.400	5.492	825859	1.71	432759	1.80	1.91	V
22	5.508	5.492	5.542	59498	0.12	37521	0.16	1.59	V
23	5.601	5.542	5.625	55068	0.11	28548	0.12	1.93	
24	5.658	5.625	5.683	154796	0.32	97780	0.41	1.58	V
25	5.701	5.683	5.725	25315	0.05	16873	0.07	1.50	V
26	5.771	5.725	5.800	26376	0.05	10411	0.04	2.53	V
27	5.825	5.800	5.842	14351	0.03	8339	0.03	1.72	V
28	5.858	5.842	5.875	8337	0.02	6083	0.03	1.37	V
29	5.908	5.883	5.942	166059	0.34	112458	0.47	1.48	
				48258155	100.00	24067414	100.00		

Figura 21 – Planta 9 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.189	3.150	3.233	20399	0.17	7636	0.20	2.67		Silane, tetramethyl-
2	3.267	3.233	3.317	4808	0.04	2209	0.06	2.18	V	Propane, 2-nitro-
3	3.478	3.317	3.633	553629	4.63	93901	2.50	5.90		p-Xylene
4	3.854	3.800	3.900	19657	0.16	5931	0.16	3.31		exo-2-Bromonorbornane
5	4.013	3.900	4.142	157835	1.32	43773	1.17	3.61	SV	D-Limonene
6	4.210	4.167	4.225	300290	2.51	144112	3.84	2.08		Cyclobutylamine
7	4.239	4.225	4.367	490577	4.10	138626	3.70	3.54	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
8	4.382	4.367	4.433	26664	0.22	11623	0.31	2.29	V	Methane, isothiocyanato-
9	4.462	4.433	4.492	12692	0.11	4697	0.13	2.70	V	Pentanenitrile, 4-methyl-
10	4.575	4.492	4.600	30073	0.25	8664	0.23	3.47	V	1,3,5,7-Cyclooctatetraene
11	4.624	4.600	4.650	27106	0.23	10248	0.27	2.65	V	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-
12	4.702	4.650	4.733	88766	0.74	31610	0.84	2.81	V	Thiocyanic acid, methyl ester
13	4.832	4.733	4.867	158812	1.33	22278	0.59	7.13	V	alpha-Methylstyrene
14	4.900	4.867	4.933	77671	0.65	20137	0.54	3.86	V	7-Hexadecenal, (Z)-
15	4.964	4.933	4.992	68854	0.58	22033	0.59	3.13	V	2-Propanone, 1-hydroxy-
16	5.058	4.992	5.092	119693	1.00	23110	0.62	5.18	V	Cyclotetracosane
17	5.119	5.092	5.150	70681	0.59	21054	0.56	3.36	V	2-Amino-1,3-propanediol
18	5.200	5.150	5.217	86194	0.72	23181	0.62	3.72	V	Ethanol, 2-(tetradecyloxy)-
19	5.282	5.217	5.325	170093	1.42	28737	0.77	5.92	V	Silane, (2-ethoxyethoxy)trimethyl-
20	5.383	5.325	5.400	105451	0.88	23682	0.63	4.45	V	Acethydrazide, N2-(2,4-dimethylphenyl)-
21	5.456	5.400	5.600	195003	1.63	32760	0.87	5.95	V	Benzene, 1-ethenyl-3-methyl-
22	5.633	5.600	5.675	9908	0.08	4267	0.11	2.32	V	dl-2-Phenyl-1,2-propanediol
23	5.700	5.675	5.717	2785	0.02	1494	0.04	1.86		Formamide, N-phenyl-
24	5.745	5.717	5.775	5637	0.05	2577	0.07	2.19	V	(7S)-trans-syn-cis-Tricyclo[7.3.0.0(2,6)-
25	5.817	5.775	5.875	3889	0.03	1056	0.03	3.68	V	Cyclohexanol, 2-methyl-, trans-
26	5.903	5.875	5.942	11918	0.10	6745	0.18	1.77		Trimethylsilyl O,O'-bis(trimethylsilyl)h
27	5.997	5.942	6.025	8709	0.07	4081	0.11	2.13		Acetic acid
28	6.084	6.025	6.108	21317	0.18	10268	0.27	2.08		1,4,7-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononan
29	6.203	6.108	6.242	272319	2.28	52927	1.41	5.15	V	Propanediamide
30	6.267	6.242	6.292	117343	0.98	74348	1.98	1.58	V	Furfural
31	6.318	6.292	6.333	16945	0.14	7878	0.21	2.15	V	Carbonocyanidic acid, ethyl ester
32	6.431	6.333	6.517	126675	1.06	20021	0.53	6.33	V	Phenol
33	6.580	6.517	6.700	397322	3.32	126525	3.37	3.14	V	Benzenethiol
34	6.746	6.700	6.783	170808	1.43	77174	2.06	2.21		Benzaldehyde
35	6.865	6.792	6.925	2095062	17.51	661029	17.62	3.17		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
36	7.063	6.925	7.175	1309474	10.94	127059	3.39	10.31	V	Butanedinitrile
37	7.217	7.175	7.308	4179598	34.93	1660284	44.26	2.52		Benzenethiol, 3-methyl-
38	7.324	7.308	7.383	394189	3.29	173553	4.63	2.27	V	Benzonitrile
39	7.397	7.383	7.425	29420	0.25	17375	0.46	1.69	V	2-Propanol, 1-(1-methylethoxy)-
40	7.452	7.425	7.458	6566	0.05	2748	0.07	2.39	V	Butanoic acid, 2-methyl-3-oxo-, ethyl e
				11964832	100.00	3751411	100.00			

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.292	3.275	3.392	14169	0.13	1976	0.08	7.17	V	Octanoic acid, 3-phenyl-2-propenyl est
2	3.408	3.392	3.508	18052	0.17	3404	0.15	5.30	V	2-Pentenal, 2-methyl-
3	3.525	3.508	3.725	17101	0.16	2020	0.09	8.47	V	2-Heptenoic acid
4	4.534	4.308	4.592	145540	1.33	12097	0.52	12.03	V	3-Butenoic acid
5	4.658	4.592	4.708	48955	0.45	7538	0.32	6.49	V	.alpha.-Methylstyrene
6	4.733	4.708	4.758	23733	0.22	7996	0.34	2.97	V	.alpha.-Methylstyrene
7	4.775	4.758	4.800	23335	0.21	9948	0.43	2.35	V	Benzene, (1-methylethyl)-
8	4.838	4.800	4.883	63671	0.58	15446	0.66	4.12	V	1-Undecanol
9	4.967	4.883	4.992	88906	0.82	15861	0.68	5.61	V	Benzeneethanol, .alpha.,.alpha.-dimeth
10	5.026	4.992	5.050	91060	0.83	31958	1.37	2.85	V	Acetic acid
11	5.078	5.050	5.108	94029	0.86	31880	1.36	2.95	V	Furfural
12	5.142	5.108	5.158	70699	0.65	24943	1.07	2.83	V	Procyclidine
13	5.178	5.158	5.208	72809	0.67	24998	1.07	2.91	V	.alpha.-Methylstyrene
14	5.225	5.208	5.258	68777	0.63	23306	1.00	2.95	V	.alpha.-Methylstyrene
15	5.292	5.258	5.317	85704	0.79	25120	1.07	3.41	V	.alpha.-Methylstyrene
16	5.499	5.317	5.625	969156	8.89	130621	5.58	7.42	V	Acetamide
17	5.791	5.725	5.842	123428	1.13	35780	1.53	3.45	V	Acetamide
18	5.917	5.842	5.983	62246	0.57	15062	0.64	4.13	V	Pyrazine, 2-methyl-6-(1-propenyl)-, (E,
19	6.054	5.983	6.108	114629	1.05	25295	1.08	4.53	V	Formamide
20	6.229	6.108	6.400	4773792	43.77	1071891	45.80	4.45	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
21	6.521	6.417	6.600	1487807	13.64	416140	17.78	3.58	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
22	6.636	6.600	6.658	17198	0.16	10138	0.43	1.70	V	2-Cyclopentene-1,4-dione
23	6.754	6.667	6.867	640614	5.87	101045	4.32	6.34	V	Benzenethiol, 3-methyl-
24	6.987	6.867	7.075	1137839	10.43	155580	6.65	7.31	V	Phenol, 4-methyl-
25	7.089	7.075	7.133	107130	0.98	39239	1.68	2.73	V	Dodecanoic acid
26	7.258	7.133	7.375	445618	4.09	64067	2.74	6.96	V	L-Alanine, N-methyl-
27	7.413	7.375	7.458	99701	0.91	37014	1.58	2.69	V	Girard's reagent T

Figura 23 – Planta 10 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.521	3.392	3.617	211419	1.62	32559	0.92	6.49		p-Xylene
2	3.983	3.950	4.183	108120	0.83	10558	0.30	10.24		Dimethyl sulfone
3	4.219	4.183	4.450	877036	6.74	149752	4.21	5.86	V	Cyclobutylamine
4	5.068	5.008	5.108	104488	0.80	30385	0.85	3.44		Acetic acid
5	5.233	5.108	5.275	293432	2.25	38871	1.09	7.55	V	.alpha.-Methylstyrene
6	5.316	5.275	5.350	372165	2.86	140552	3.95	2.65	V	Acetic acid
7	5.385	5.350	5.417	361737	2.78	123580	3.48	2.93	V	Furfural
8	5.446	5.417	5.633	503883	3.87	81490	2.29	6.18	V	Benzeneethanamine, 2-methoxy-N,.alpi
9	5.909	5.833	5.975	799056	6.14	195016	5.49	4.10	V	Propanediamide
10	6.017	5.975	6.042	230008	1.77	64161	1.81	3.58	V	Methanediamine, N,N,N',N'-tetramethy
11	6.110	6.042	6.392	2228821	17.13	463882	13.05	4.80	SV	Formic acid
12	6.645	6.542	6.717	4202497	32.29	1227860	34.55	3.42		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
13	6.875	6.783	6.900	343613	2.64	87413	2.46	3.93		Benzenethiol, 3-methyl-
14	6.937	6.900	6.983	372283	2.86	119029	3.35	3.13	V	Benzonitrile
15	7.025	6.983	7.083	164736	1.27	38581	1.09	4.27	V	O-Ethyl S-2-dimethylaminoethyl ethyl
16	7.120	7.083	7.150	112984	0.87	55115	1.55	2.05	V	Butyrolactone
17	7.226	7.183	7.267	1034209	7.95	400072	11.26	2.59		Benzenethiol, 3-methyl-
18	7.282	7.267	7.300	228126	1.75	128904	3.63	1.77	V	2-Propenoic acid
19	7.328	7.300	7.375	359158	2.76	128680	3.62	2.79	V	Benzonitrile
20	7.410	7.375	7.442	105433	0.81	37902	1.07	2.78	V	N'-Benzyl-N,N-dimethylethylenediami
				13013204	100.00	3554362	100.00			

Figura 24 – Planta 11 hidratada, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.188	3.125	3.233	27199	0.12	7407	0.10	3.67		Silane, tetramethyl-
2	3.267	3.233	3.300	23654	0.10	7294	0.10	3.24	V	Benzenemethanol, alpha.,alpha.-dimet
3	3.355	3.300	3.375	117073	0.50	35595	0.50	3.29	V	2-Butanone, 3-chloro-
4	3.419	3.375	3.442	223603	0.95	67761	0.94	3.30	V	Bi-2-cyclohexen-1-yl
5	3.497	3.442	3.625	715279	3.03	119540	1.66	5.98	V	p-Xylene
6	3.642	3.625	3.658	46784	0.20	24112	0.34	1.94	V	Benzenemethanol, alpha.-methyl-.alph
7	3.723	3.658	3.750	124291	0.53	24509	0.34	5.07	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
8	3.899	3.750	3.933	303165	1.28	34817	0.48	8.71	V	.alpha.-Ethyl-.alpha.-methylbenzyl alcc
9	4.014	3.933	4.050	359618	1.52	84726	1.18	4.24	V	D-Limonene
10	4.087	4.050	4.208	1639685	6.94	369470	5.14	4.44	V	Acetic anhydride
11	4.244	4.208	4.308	525130	2.22	181618	2.53	2.89	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
12	4.335	4.308	4.350	109498	0.46	44779	0.62	2.45	V	Benzoic acid, 4-(acetyloxy)-
13	4.384	4.350	4.433	370231	1.57	131177	1.82	2.82	V	Methane, isothiocyanato-
14	4.467	4.433	4.483	152198	0.64	52059	0.72	2.92	V	.alpha.-Ethyl-.alpha.-methylbenzyl alcc
15	4.580	4.483	4.625	620118	2.63	103466	1.44	5.99	V	Styrene
16	4.700	4.625	4.733	1011827	4.29	390946	5.44	2.59	V	Thiocyanic acid, methyl ester
17	4.966	4.733	5.058	2240975	9.49	145765	2.03	15.37	V	Benzene, 1-methyl-4-(phenylmethyl)-
18	5.075	5.058	5.200	771186	3.27	100994	1.40	7.64	V	Benzenemethanol, alpha.,alpha.-dimet
19	5.240	5.200	5.325	579427	2.45	123398	1.72	4.70	V	Formamide, N,N-dimethyl-
20	5.345	5.325	5.433	309371	1.31	54238	0.75	5.70	V	4-Pyridinecarboxitrile
21	5.452	5.433	5.542	131192	0.56	49381	0.69	2.66	V	Cyanamide, dimethyl-
22	5.694	5.558	5.717	62669	0.27	6697	0.09	9.36		4-Pyridinecarboxitrile
23	5.913	5.875	5.933	49254	0.21	26523	0.37	1.86		Acetamide, N,N-dimethyl-
24	6.075	5.983	6.092	55673	0.24	7767	0.11	7.17		dl-Citrulline
25	6.156	6.100	6.217	1149303	4.87	480930	6.69	2.39		Ethanimidic acid, ethyl ester
26	6.265	6.233	6.292	556036	2.35	366752	5.10	1.52		Furfural
27	6.461	6.292	6.492	441380	1.87	26635	0.37	16.57	V	1,1'-Biphenyl, 2-methyl-
28	6.574	6.500	6.675	1373084	5.82	387224	5.39	3.55		Benzenethiol
29	6.748	6.708	6.767	118830	0.50	66379	0.92	1.79		Benzaldehyde
30	6.888	6.833	6.925	735192	3.11	224232	3.12	3.28		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
31	6.962	6.925	6.975	181845	0.77	58243	0.81	3.12	V	Benzenemethanol, alpha.-methyl-.alph
32	6.992	6.975	7.008	61432	0.26	39549	0.55	1.55	V	Benzenemethanol, alpha.,alpha.-dimet
33	7.071	7.017	7.083	61797	0.26	23639	0.33	2.61		2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
34	7.210	7.083	7.300	7455130	31.57	2992661	41.63	2.49		Benzenethiol, 3-methyl-
35	7.326	7.300	7.367	707446	3.00	242651	3.38	2.92	V	Benzonitrile
36	7.393	7.367	7.417	201868	0.85	86577	1.20	2.33	V	Benzenemethanol, alpha.,alpha.-dimet
				23612443	100.00	7189511	100.00			

Figura 25 – Planta 11 sob estresse, folha 7

Figura 26 – Planta 12 hidratada, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.189	3.133	3.233	12690	0.09	4946	0.10	2.57		1,3-Dioxolane, 2-(1-phenylethyl)-
2	3.433	3.325	3.458	106933	0.74	27275	0.54	3.92		o-Xylene
3	3.521	3.458	3.675	205139	1.42	35887	0.71	5.72	V	1-Butanol
4	3.825	3.792	3.842	17802	0.12	7817	0.15	2.28		2-Propenoic acid, butyl ester
5	3.856	3.842	3.908	19369	0.13	8301	0.16	2.33	V	Bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxaldehyc
6	4.015	3.942	4.050	105489	0.73	37372	0.73	2.82		D-Limonene
7	4.075	4.050	4.175	611928	4.22	225716	4.44	2.71	V	Cyclobutylamine
8	4.190	4.175	4.225	11699	0.08	7110	0.14	1.65	V	Furan, 2-methyl-
9	4.281	4.225	4.308	33071	0.23	10903	0.21	3.03		Benzene, 1-ethyl-4-methyl-
10	4.405	4.358	4.425	14640	0.10	4935	0.10	2.97		1-Dodecanol
11	4.579	4.433	4.642	154860	1.07	46996	0.92	3.30		Styrene
12	4.705	4.642	4.725	68745	0.47	23808	0.47	2.89	V	Thiocyanic acid, methyl ester
13	4.902	4.725	4.917	311004	2.15	38314	0.75	8.12	V	Benzene, 1-methyl-2-(phenylmethyl)-
14	4.964	4.917	4.992	201778	1.39	61626	1.21	3.27	V	2-Propanone, 1-hydroxy-
15	5.059	4.992	5.100	239428	1.65	38685	0.76	6.19	V	Benzonitrile, 2-methyl-
16	5.123	5.100	5.167	118794	0.82	36072	0.71	3.29	V	Hydrazine, 1,1-dimethyl-
17	5.244	5.167	5.325	166042	1.15	24233	0.48	6.85	V	N,N-Dimethylformamide dipropyl acet
18	5.392	5.325	5.417	52940	0.37	10864	0.21	4.87	V	1,2-Propanediol, 3-methoxy-
19	5.454	5.417	5.500	47623	0.33	16829	0.33	2.83	V	.alpha.-Methylstyrene
20	5.700	5.525	5.717	180145	1.24	23392	0.46	7.70		Ethanol, 2-(2-methoxyethoxy)-
21	5.848	5.717	5.883	253252	1.75	35104	0.69	7.21	V	2-Heptanol, 3-methyl-
22	5.902	5.883	5.925	41230	0.28	18167	0.36	2.27	V	Trimethylsilyl O,O'-bis(trimethylsilyl)
23	6.012	5.925	6.050	150837	1.04	26254	0.52	5.75	V	Ethanol, 2-(2-methoxyethoxy)-
24	6.076	6.050	6.108	44879	0.31	23067	0.45	1.95	V	Formamide, N,N-diethyl-
25	6.150	6.117	6.175	174789	1.21	114303	2.25	1.53		Acetic acid
26	6.264	6.175	6.292	664656	4.59	233684	4.60	2.84	V	Furfural
27	6.580	6.433	6.617	891386	6.15	160389	3.15	5.56		Benzenethiol
28	6.638	6.617	6.708	329589	2.27	129053	2.54	2.55	V	Cyclopentene
29	6.743	6.708	6.767	55288	0.38	29566	0.58	1.87		Benzaldehyde
30	6.913	6.767	7.033	2700448	18.64	833932	16.40	3.24		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
31	7.208	7.033	7.258	5371790	37.07	2285362	44.94	2.35		Benzenethiol, 3-methyl-
32	7.272	7.258	7.300	616096	4.25	336083	6.61	1.83	V	Benzenethiol, 2-methyl-
33	7.323	7.300	7.408	515262	3.56	168913	3.32	3.05	V	Benzonitrile
				14489621	100.00	5084958	100.00			

Figura 27 – Planta 12 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	4.042	4.008	4.208	1443100	11.07	442524	8.25	3.26	S	Acetic acid ethenyl ester
2	4.244	4.208	4.308	179444	1.38	92366	1.72	1.94		1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
3	4.579	4.542	4.633	157173	1.21	67963	1.27	2.31		Styrene
4	4.700	4.633	4.942	388462	2.98	33829	0.63	11.48	V	Thiocyanic acid, methyl ester
5	4.962	4.942	5.042	148389	1.14	58736	1.09	2.53	V	2-Propanone, 1-hydroxy-
6	6.000	5.967	6.117	94052	0.72	24915	0.46	3.77		Acetic acid
7	6.149	6.117	6.167	223525	1.71	142795	2.66	1.57		Acetic acid
8	6.215	6.167	6.242	666851	5.11	217749	4.06	3.06	V	Propanediamide
9	6.264	6.242	6.292	459893	3.53	294144	5.48	1.56	V	Furfural
10	6.450	6.350	6.517	162498	1.25	29047	0.54	5.59		1,1'-Biphenyl, 2-methyl-
11	6.572	6.517	6.608	441497	3.39	132799	2.47	3.32	V	Benzenethiol
12	6.633	6.608	6.667	203823	1.56	92496	1.72	2.20	V	Fomic acid
13	6.750	6.708	6.767	125872	0.97	52337	0.98	2.41		Benzaldehyde
14	6.808	6.767	6.842	179614	1.38	45732	0.85	3.93	V	Decane, 1-chloro-
15	6.893	6.842	6.942	845436	6.48	270420	5.04	3.13	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
16	7.017	6.942	7.042	174592	1.34	26234	0.49	6.66	V	Benzenesulfonamide, N,N,4-trimethyl-
17	7.058	7.042	7.083	35615	0.27	19617	0.37	1.82	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
18	7.209	7.092	7.258	5735873	44.00	2614783	48.73	2.19		Benzenethiol, 3-methyl-
19	7.272	7.258	7.300	725902	5.57	386571	7.20	1.88	V	Benzenethiol, 2-methyl-
20	7.324	7.300	7.375	645652	4.95	320704	5.98	2.01	V	Benzonitrile
				13037263	100.00	5365761	100.00			

Figura 28 – Planta 13 hidratada, folha 7

Figura 29 – Planta 13 sob estresse, folha 7

Figura 30 – Planta 14 hidratada, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.425	3.375	3.558	225804	1.34	53079	0.80	4.25		p-Xylene
2	4.007	3.967	4.175	3126948	18.51	870886	13.11	3.59		2-Propanone, 1-bromo-
3	4.244	4.175	4.308	209853	1.24	92627	1.39	2.27	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
4	4.590	4.533	4.658	308907	1.83	84284	1.27	3.67		Styrene
5	4.700	4.658	4.942	282506	1.67	34944	0.53	8.08	V	Methane, isothiocyanato-
6	4.964	4.942	5.000	27653	0.16	17108	0.26	1.62	V	2-Propanone, 1-hydroxy-
7	5.833	5.800	6.033	53251	0.32	12972	0.20	4.11		Acetic acid
8	6.151	6.108	6.167	271276	1.61	139758	2.10	1.94		Acetic acid
9	6.183	6.167	6.225	192348	1.14	96991	1.46	1.98	V	Propanediamide
10	6.265	6.225	6.292	393855	2.33	263860	3.97	1.49	V	Furfural
11	6.308	6.292	6.383	56762	0.34	25539	0.38	2.22	V	Pyridine-D5-
12	6.562	6.383	6.608	1004562	5.95	273536	4.12	3.67		Benzenethiol
13	6.642	6.608	6.675	378982	2.24	196543	2.96	1.93	V	Pyrrrole
14	6.741	6.708	6.767	160794	0.95	94863	1.43	1.70		Benzaldehyde
15	6.830	6.767	6.883	930772	5.51	287278	4.32	3.24	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
16	6.933	6.883	6.967	158987	0.94	39129	0.59	4.06	V	Mandelic acid di(tert-butyl)dimethylsilyl
17	6.983	6.967	7.033	61466	0.36	24957	0.38	2.46	V	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan
18	7.067	7.033	7.083	34906	0.21	18056	0.27	1.93		2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
19	7.207	7.083	7.300	8281682	49.03	3668016	55.21	2.26		Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.323	7.300	7.383	730912	4.33	348850	5.25	2.10	V	Benzonitrile
				16892226	100.00	6643276	100.00			

Figura 31 – Planta 14 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.502	3.375	3.608	325490	3.39	45847	1.16	7.10		p-Xylene
2	4.041	3.975	4.150	784913	8.17	278670	7.05	2.82		Cyclobutylamine
3	4.245	4.208	4.275	61601	0.64	34064	0.86	1.81		1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
4	4.578	4.542	4.625	80591	0.84	29867	0.76	2.70		Styrene
5	4.700	4.625	4.942	405271	4.22	34719	0.88	11.67	V	Thiocyanic acid, methyl ester
6	5.243	5.208	5.275	79251	0.82	47464	1.20	1.67		Formamide, N,N-dimethyl-
7	6.149	6.108	6.167	255895	2.66	150655	3.81	1.70		Acetic acid
8	6.215	6.167	6.242	492258	5.12	141999	3.59	3.47	V	Propanediamide
9	6.264	6.242	6.292	355055	3.69	202469	5.12	1.75	V	Furfural
10	6.308	6.292	6.392	108738	1.13	32373	0.82	3.36	V	1,2,3-Tris-(2-cyanoethoxy)-propane
11	6.467	6.392	6.533	592988	6.17	102344	2.59	5.79	V	Phenol
12	6.572	6.533	6.600	293514	3.05	97675	2.47	3.01	V	Benzenethiol
13	6.617	6.600	6.658	96975	1.01	50890	1.29	1.91	V	Formic acid
14	6.748	6.717	6.767	63688	0.66	33470	0.85	1.90		Benzaldehyde
15	6.848	6.767	6.900	478076	4.97	149071	3.77	3.21	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
16	6.942	6.900	6.975	127315	1.32	36933	0.93	3.45	V	.alpha.-Ethyl-.alpha.-methylbenzyl alcc
17	6.992	6.975	7.042	70885	0.74	27535	0.70	2.57	V	Ethanol, 2-(1-methylethoxy)-
18	7.208	7.083	7.258	4507847	46.91	2204643	55.80	2.04	V	Benzenethiol, 3-methyl-
19	7.275	7.258	7.300	338014	3.52	203687	5.16	1.66	V	Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.325	7.300	7.350	91866	0.96	46287	1.17	1.98	V	Benzonitrile
				9610231	100.00	3950662	100.00			

Figura 32 – Planta 15 hidratada, folha 7

Peak Report TIC									
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark
1	3.350	3.308	3.383	91002	0.49	27493	0.35	3.31	
2	3.417	3.383	3.450	282367	1.53	85472	1.08	3.30	V
3	3.483	3.450	3.633	496244	2.69	101766	1.28	4.88	V
4	4.022	3.975	4.167	1473531	7.99	478550	6.04	3.08	
5	4.244	4.167	4.308	280426	1.52	144889	1.83	1.94	V
6	4.384	4.350	4.425	127631	0.69	79411	1.00	1.61	
7	4.578	4.425	4.617	80548	0.44	32467	0.41	2.48	V
8	4.699	4.617	4.750	730618	3.96	448062	5.65	1.63	V
9	5.243	5.208	5.267	57531	0.31	35555	0.45	1.62	
10	5.455	5.425	5.533	59370	0.32	27171	0.34	2.19	
11	6.075	6.025	6.108	54158	0.29	22067	0.28	2.45	
12	6.147	6.117	6.175	224614	1.22	150480	1.90	1.49	
13	6.265	6.175	6.342	1036989	5.62	475677	6.00	2.18	V
14	6.483	6.342	6.533	298030	1.62	38691	0.49	7.70	V
15	6.568	6.533	6.667	1036868	5.62	419502	5.29	2.47	V
16	6.746	6.667	6.775	140704	0.76	85586	1.08	1.64	V
17	6.909	6.842	7.025	3089145	16.75	959973	12.11	3.22	
18	7.067	7.025	7.092	86458	0.47	54901	0.69	1.57	V
19	7.208	7.092	7.300	8521316	46.21	4150398	52.36	2.05	
20	7.324	7.300	7.375	273343	1.48	108422	1.37	2.52	V
				18440893	100.00	7926533	100.00		

Figura 33 – Planta 15 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.426	3.375	3.542	199503	1.11	50837	0.70	3.92		p-Xylene
2	4.001	3.967	4.158	2618108	14.57	798256	11.04	3.28		Cyclobutylamine
3	4.242	4.158	4.317	324235	1.80	149181	2.06	2.17	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
4	4.575	4.542	4.675	34396	0.19	15981	0.22	2.15		Styrene
5	4.702	4.675	4.750	75130	0.42	38783	0.54	1.94		Methane, isothiocyanato-
6	5.456	5.425	5.492	30163	0.17	16280	0.23	1.85		.alpha.-Methylstyrene
7	5.900	5.875	6.025	29975	0.17	6804	0.09	4.41		Trimethylsilyl O,O'-bis(trimethylsilyl)
8	6.050	6.025	6.117	61439	0.34	20084	0.28	3.06	V	2(3H)-Furanone, 5-methyl-
9	6.146	6.117	6.175	269307	1.50	170530	2.36	1.58		Acetic acid
10	6.265	6.175	6.350	2492385	13.87	932179	12.90	2.67	V	Furfural
11	6.383	6.350	6.433	370371	2.06	88756	1.23	4.17	V	1,1'-Biphenyl, 3-methyl-
12	6.565	6.433	6.600	721425	4.02	168338	2.33	4.29	V	Benzenethiol
13	6.608	6.600	6.625	138280	0.77	103269	1.43	1.34	V	Fomic acid
14	6.642	6.625	6.708	218465	1.22	117253	1.62	1.86	V	Pyrole
15	6.742	6.708	6.758	109092	0.61	62804	0.87	1.74		Benzaldehyde
16	6.817	6.758	6.842	112760	0.63	20946	0.29	5.38	V	12-Crown-4
17	6.920	6.850	7.025	820041	4.56	195247	2.70	4.20		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
18	7.066	7.025	7.092	95356	0.53	59564	0.82	1.60	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
19	7.206	7.092	7.300	8579442	47.76	3825915	52.94	2.24		Benzenethiol, 2-methyl-
20	7.324	7.300	7.358	664237	3.70	386320	5.35	1.72	V	Benzonitrile
				17964110	100.00	7227327	100.00			

Figura 34 – Planta 16 hidratada, folha 7

Figura 35 – Planta 16 sob estresse, folha 7

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.422	3.383	3.450	181087	1.19	60023	0.98	3.02	V	p-Xylene
2	3.500	3.450	3.633	367489	2.42	66195	1.08	5.55	V	p-Xylene
3	4.009	3.942	4.150	1951569	12.85	618193	10.10	3.16		2-Propanone, 1-bromo-
4	4.243	4.150	4.317	585771	3.86	256811	4.19	2.28	V	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-
5	4.384	4.317	4.433	67462	0.44	29559	0.48	2.28	V	Methane, isothiocyanato-
6	4.578	4.533	4.633	99724	0.66	44475	0.73	2.24		Styrene
7	4.700	4.667	4.750	180598	1.19	104375	1.70	1.73		Thiocyanic acid, methyl ester
8	5.455	5.417	5.550	93685	0.62	35218	0.58	2.66		.alpha.-Methylstyrene
9	5.825	5.792	5.883	62113	0.41	20908	0.34	2.97	V	2(5H)-Furanone
10	6.075	5.975	6.108	89062	0.59	26272	0.43	3.39		1,4,7-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononan
11	6.147	6.108	6.175	353675	2.33	212543	3.47	1.66	V	Acetic acid
12	6.264	6.175	6.300	1155909	7.61	583006	9.52	1.98	V	Furfural
13	6.383	6.300	6.417	107998	0.71	17872	0.29	6.04	V	Pentaethylene glycol
14	6.450	6.417	6.525	143186	0.94	34933	0.57	4.10	V	1,1'-Biphenyl, 2-methyl-
15	6.574	6.525	6.708	694143	4.57	134407	2.20	5.16	V	Benzenethiol
16	6.913	6.767	6.992	643874	4.24	190715	3.11	3.38	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
17	7.066	6.992	7.092	127727	0.84	47226	0.77	2.70	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
18	7.207	7.125	7.300	7562859	49.78	3344731	54.62	2.26		Benzenethiol, 3-methyl-
19	7.325	7.300	7.358	588249	3.87	265581	4.34	2.21	V	Benzonitrile
20	7.400	7.358	7.417	135226	0.89	30203	0.49	4.48	V	Ethanol, 2-(1-methylethoxy)-
				15191406	100.00	6123246	100.00			

Figura 36 – Planta 17 hidratada, folha 7

Figura 37 – Planta 17 sob estresse, folha 7

Figura 38 – Planta 18 hidratada, folha 7

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC				A/H	Mark	Name
				Area	Area%	Height	Height%			
1	3.425	3.375	3.458	218793	1.35	58055	0.84	3.77		1,3-Cyclopentadiene, 5-(1-methylethyl)-
2	3.508	3.458	3.692	776478	4.81	152242	2.19	5.10	V	p-Xylene
3	4.009	3.975	4.150	1504019	9.31	545836	7.86	2.76		2-Propanone, 1-bromo-
4	4.383	4.358	4.550	158965	0.98	22219	0.32	7.15		Methane, isothiocyanato-
5	4.579	4.550	4.617	187191	1.16	67113	0.97	2.79	V	Styrene
6	4.702	4.617	4.758	515057	3.19	226365	3.26	2.28	V	Thiocyanic acid, methyl ester
7	5.233	5.208	5.433	179451	1.11	31153	0.45	5.76		Formamide, N,N-dimethyl-
8	5.758	5.717	5.800	112822	0.70	50133	0.72	2.25		Acetic acid
9	5.908	5.883	6.033	90938	0.56	19391	0.28	4.69		Acetamide, N,N-dimethyl-
10	6.147	6.117	6.167	355422	2.20	221701	3.19	1.60		Acetic acid
11	6.207	6.167	6.242	620822	3.84	200333	2.88	3.10	V	Propanediamide
12	6.265	6.242	6.292	976851	6.05	653153	9.40	1.50	V	Furfural
13	6.408	6.375	6.483	141234	0.87	25112	0.36	5.62	V	Benzaldehyde
14	6.571	6.483	6.633	1231009	7.62	371304	5.34	3.32	V	Benzenethiol
15	6.749	6.633	6.783	266124	1.65	90636	1.30	2.94	V	Benzaldehyde
16	6.900	6.842	6.950	240052	1.49	54241	0.78	4.43		Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
17	6.992	6.950	7.033	184625	1.14	52555	0.76	3.51	V	Benzenethiol, 3-methyl-
18	7.066	7.033	7.092	210879	1.31	122785	1.77	1.72	V	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-
19	7.208	7.142	7.300	7987107	49.43	3883610	55.90	2.06		Benzenethiol, 3-methyl-
20	7.328	7.300	7.350	201151	1.24	99285	1.43	2.03	V	Benzonitrile
				16158990	100.00	6947222	100.00			

Figura 39 – Planta 18 sob estresse, folha /

Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.464	3.383	3.683	1250266	5.75	181320	1.87	6.90		p-Xylene
2	3.866	3.833	3.917	196337	0.90	83395	0.86	2.35		Acetic anhydride
3	4.009	3.917	4.117	1456682	6.70	545757	5.63	2.67	V	2-Propanone, 1-bromo-
4	4.575	4.533	4.608	197147	0.91	94584	0.98	2.08		Styrene
5	4.699	4.608	4.742	204878	0.94	90690	0.94	2.26	V	Thiocyanic acid, methyl ester
6	5.058	5.033	5.175	172641	0.79	41444	0.43	4.17	V	1-Decanol, 2-hexyl-
7	5.240	5.175	5.267	168210	0.77	45191	0.47	3.72	V	Formamide, N,N-dimethyl-
8	6.146	6.092	6.208	986488	4.54	414187	4.27	2.38	V	Ethanimidic acid, ethyl ester
9	6.265	6.233	6.292	274131	1.26	183520	1.89	1.49		Furfural
10	6.565	6.525	6.667	3982705	18.33	1933131	19.94	2.06		Benzenethiol
11	6.745	6.667	6.775	466960	2.15	265021	2.73	1.76	V	Benzaldehyde
12	6.825	6.775	6.875	421598	1.94	137218	1.42	3.07	V	Benzaldehyde, 2,4-dimethyl-
13	6.950	6.883	7.042	313290	1.44	53139	0.55	5.90		Pentaethylene glycol
14	7.209	7.100	7.300	11209286	51.58	5460316	56.33	2.05		Benzenethiol, 3-methyl-
15	7.326	7.300	7.375	429318	1.98	165116	1.70	2.60	V	Benzonitrile
				21729937	100.00	9694029	100.00			

Figura 40 – Planta 19 hidratada, folha 7

Figura 41 – Planta 19 sob estresse, folha 7

Figura 42 – Planta 20 hidratada, folha 7

Figura 43 – Planta 20 sob estresse, folha 7