Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas
e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.)**

Ana Cláudia Pacheco

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

Piracicaba

2007

**Ana Cláudia Pacheco
Engenheira Agrônoma**

**Deficiência hídrica e aplicação de ABA
sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides
em calêndula (*Calendula officinalis* L.)**

**Orientador:
Prof. Dr. PAULO ROBERTO CAMARGO E CASTRO**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Pacheco, Ana Cláudia

Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) / Ana Cláudia Pacheco. - - Piracicaba, 2007.
61 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Balanço hídrico 2. Compositae 3. Fisiologia vegetal 4. Flavonóides 5.
Plantas medicinais I. Título

CDD 633.88

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

Ao meu filho Pedro Ernesto e a Daniel, pelo amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pelo aprendizado profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Camargo e Castro, pela confiança e orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Maia Souza, pela amizade e colaboração neste trabalho.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz (ESALQ/USP), pela disponibilização da estufa para a instalação do experimento.

Ao Prof. Dr. Lázaro Peres (ESALQ/USP), pela concessão de reagentes.

À Prof. Dra. Maria Luisa Salatino (Instituto de Biociências/USP), pela orientação quanto à metodologia da análise fitoquímica.

A Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela concessão de afastamento e disponibilização de Laboratórios.

À Maria Solizete Granziol Silva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade e solicitude.

Ao colega Agnaldo Sato, pela ajuda recebida na utilização do software.

Aos meus pais, Aquilino e Regina, pelo acolhimento, apoio e incentivo.

A Deus, por todas as coisas, mas principalmente, pela oportunidade de estudar.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Aspectos da Cultura.....	9
2.2 Metabolismo Secundário em Plantas.....	10
2.3 Efeito da Água sobre a Produção de Princípios Ativos.....	12
2.4 Ácido Abscísico e Déficit Hídrico em Plantas.....	16
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Localização dos Experimentos.....	20
4.2 Preparo das mudas e plantio dos vasos.....	20
4.3 Tratamentos.....	21
4.4 Delineamento Experimental.....	22
4.5 Variáveis analisadas.....	23
4.5.1 Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	23
4.5.2 Trocas Gasosas.....	23
4.5.3 Teor de Flavonóides Totais.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Trocas gasosas e Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	26
5.1.1 Três dias de suspensão da irrigação.....	26
5.1.2 Seis dias de suspensão da irrigação.....	28
5.1.3 Nove dias de suspensão da irrigação.....	33
5.2 Teor de Flavonóides Totais.....	42
6 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

RESUMO

Deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas e o acúmulo de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.)

Foram estudados os efeitos da deficiência hídrica e da aplicação de ácido abscísico (ABA) sobre alguns aspectos fisiológicos e a produção de flavonóides em plantas de calêndula. Testaram-se quatro intervalos de suspensão da irrigação (controle - irrigação diária; 3; 6 e 9 dias sem irrigar) acompanhados por três doses de ABA (0, 10 e 100 μM), resultando em 12 tratamentos. O experimento foi instalado em condições de casa de vegetação com plantas envasadas. Os tratamentos foram aplicados no início do florescimento e seus efeitos foram avaliados pelo conteúdo relativo de água na folha (CRA) e trocas gasosas (A = fotossíntese líquida, g_s = condutância estomática, E = transpiração, C_i = concentração intercelular de CO_2 e TL = temperatura da folha); por meio de analisador portátil por infra-vermelho. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como A/E . Aos 3 dias de suspensão da irrigação as plantas de calêndula não apresentaram alterações significativas nas variáveis de trocas gasosas avaliadas. Aos 6 dias de deficiência hídrica as variáveis C_i , CRA e EUA não apresentaram diferença em relação aos tratamentos com suprimento constante de água, acrescidos ou não de ABA. Porém, a imposição de estresse hídrico somada à aplicação de ABA nas plantas resultou em diminuição nos valores de E , g_s , A e TL em relação aos tratamentos controle. Aos 9 dias sem irrigar ocorreram mudanças drásticas nas plantas, sendo que todos os parâmetros de trocas gasosas avaliados apresentaram reduções significativas em relação aos tratamentos controle (irrigação diária com ou sem ABA). Concluiu-se que a aplicação exógena de ABA mimetizou as respostas fotossintéticas da planta ao estresse hídrico, sendo que o efeito principal deste biorregulador foi o de causar diminuição na g_s . Porém, esta redução na g_s só foi acompanhada de uma redução em A quando as plantas estavam submetidas à deficiência hídrica. O efeito residual do ABA nas plantas foi de apenas 7-8 dias e portanto, as variações observadas aos 6 dias de deficiência hídrica foram provavelmente induzidas pelo ABA; enquanto que as diferenças observadas aos 9 dias foram exclusivamente causadas pela deficiência hídrica. Não houve diferença significativa entre as diferentes intensidades de deficiência hídrica testadas com relação ao acúmulo de flavonóides nas inflorescências de calêndula. Entretanto, a aplicação de ABA provocou uma diminuição de até 50% no teor de flavonóides, tanto nas plantas controle (bem hidratadas) como nas plantas submetidas ao estresse hídrico, para todas as intensidades testadas. Concluiu-se que o ABA restringe a rota biossintética de flavonóides.

Palavras chave: Planta medicinal; Deficiência hídrica; Trocas gasosas; Flavonóides

ABSTRACT

Water deficit and ABA application on leaf gas exchange and flavonoid content in marigold (*Calendula officinalis* L.)

It was evaluated the effects of water deficit and abscisic acid (ABA) application on some physiological parameters and flavonoid production in marigold plants. It was tested four intervals of withholding water (control – diary irrigation, 3, 6 and 9 days without irrigation) accomplished of 3 concentrations of ABA (0, 10 e 100 μM), resulting in 12 treatments. The experiment was performed under nursery conditions with plotted plants. The treatments were applied in the beginning of blooming and their effects were evaluated by the relative water content (RWC) and leaf gas exchange (A = net photosynthesis, g_s = stomatal conductance, E = evaporation, C_i = CO_2 intercellular concentration and T_L =leaf temperature); using a portable infrared gas analyzer. The water use efficiency (EUA) was calculated as A/E . At 3 days of water suppression the marigold plants did not showed significant alterations in leaf gas exchange evaluated parameters. At 6 days of water deficit the parameters C_i , RWC and EUA did not showed difference in relation to the treatments with daily irrigation, added or not of ABA. However, the water stress plus ABA application resulted in smaller values of E , g_s and A in relation to control plants. At 9 days of water deficit there were drastic changes in the plants, with significant reductions in all leaf gas exchange parameters evaluated in relation to control treatments (daily irrigation with or without ABA). It was concluded that exogenous ABA application mimics the plant photosynthetic responses to water stress, and the main ABA effect was to cause a reduction on g_s . However, this g_s reduction only was accomplished of a reduction in A when the plants were submitted to the water deficit. The residual effect of ABA in plants was only 7-8 days and so, the differences observed at the 6 days of water deficit were probably inducted by the ABA, yet differences observed at the 9 days were exclusively caused by the water deficit. There was no significant difference among the different levels of water deficit used in relation to total flavonoids content in inflorescences of marigold. However, ABA application resulted in a reduction of almost 50% in flavonoids content, in well watered plant as well as stressed plants, for all levels of water deficit tested. It was concluded that ABA restricts the biosynthetic rote of flavonoids.

Keywords: Medicinal plant; Water deficit; Leaf gas exchange; Flavonoids

1 INTRODUÇÃO

Normalmente, os problemas envolvidos no cultivo de plantas medicinais exóticas, ou seja, que não são nativas, residem na adaptação da tecnologia de cultivo, já desenvolvida em seus países de origem, para as condições brasileiras.

A outra parte do problema reside no fato de que as espécies exóticas, como é o caso da calêndula, já foram selecionadas e melhoradas em seus países de origem e existe no mercado a oferta de diferentes cultivares. No entanto, como ainda não se sabe qual variedade é a mais indicada para o cultivo em determinado local, é necessário que o produtor faça um pré-cultivo com a maior quantidade de cultivares que ele conseguir, a fim de escolher aquele que melhor se adapta a sua propriedade. Neste sentido, a expressão “tipo químico” ou “raça química” vem sendo usada para designar cultivares produtores de princípios ativos em uma composição específica.

Segundo Montanari Junior (2004), dentre os fatores de qualidade que influenciam o padrão da matéria prima obtida a partir de plantas medicinais são citados: 1) o ambiente (fatores climáticos), 2) o estágio de desenvolvimento da planta, 3) as operações de pós-colheita (secagem e armazenamento) e 4) a genética da planta (características herdáveis).

Com relação ao ambiente, a água é uma variável ambiental que exerce influência direta sobre desenvolvimento da planta e sua produção de princípios ativos. O teor destas substâncias pode aumentar ou diminuir de acordo com a variação deste fator (FURLAN, 1998).

Uma planta medicinal, cultivada sob a aplicação de diferentes quantidades de água, poderá apresentar alterações qualitativas e quantitativas no seu metabolismo secundário. Para determinar se a alteração foi benéfica ou prejudicial, deve ser feita uma análise química baseada na relação

quantidade de massa seca / teor de princípios ativos, o que estabelecerá se a alteração no manejo de cultivo foi adequada ou não (MONTANARI JUNIOR, 2004).

No Brasil são poucos os estudos sobre o efeito de diferentes regimes hídricos na produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, em praticamente todas as culturas. Muitos aspectos com relação à ecofisiologia destas plantas precisam ser esclarecidos, visando uma relação custo-benefício vantajosa.

A falta de informação sobre os efeitos de diferentes regimes hídricos em plantas medicinais limita o avanço da tecnologia de cultivo destas espécies, especialmente em ambiente protegido. Assim, torna-se fundamental o desenvolvimento imediato e abrangente de estudos para a determinação mais adequada dos níveis de água a serem aplicados ao longo do ciclo da planta, tornando possível o conhecimento das prováveis alterações em seu metabolismo, rendimento e a qualidade da produção de princípios ativos.

Quando são reveladas algumas características distintas do metabolismo secundário em plantas medicinais, ocorre a possibilidade de manipulação das condições de cultivo visando aumentar o valor comercial destas espécies, alcançando maior competitividade no mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos da cultura

Calendula officinalis L. (Asteraceae), conhecida como calêndula ou malmequer, é uma espécie amplamente utilizada em todo o mundo como planta medicinal. É considerada antiespasmódica, antiinflamatória, antiséptica, cicatrizante, depurativa, emenagoga, emoliente e sudorífica ; sendo que a parte da planta usada como droga vegetal consiste das flores liguladas e escassas flores tubulosas presentes na inflorescência (capítulos florais).

Suas flores apresentam coloração amarela, alaranjada, esverdeada ou amarelas com o centro avermelhado. Além das variedades apropriadas para fins medicinais, existem ainda variedades cultivadas no sul do Brasil para fins ornamentais (LORENZI ; MATOS, 2002). Na indústria cosmética, a calêndula é utilizada para a composição de xampus, cremes e sabonetes e na indústria alimentícia, como corante natural (MONTANARI JUNIOR, 2004).

Entre os constituintes químicos potencialmente ativos da calêndula, são citados óleo essencial (até 0,02%), saponinas, flavonóides, carotenóides, mucilagens, resinas e princípio amargo (PANIZZA, 1998). De acordo com a Farmacopéia Brasileira, para o doseamento da calêndula é feita apenas a determinação de flavonóides totais, calculados como hiperosídeo ($C_{21}H_{20}O_{12}$) em relação ao material dessecado. A droga vegetal não deve conter menos que 0,4% de flavonóides totais. Esta planta consta da relação de espécies que possuem registro simplificado para a produção de fitoterápicos na ANVISA.

A cultura é uma alternativa promissora para as pequenas propriedades que utilizam mão de obra familiar pois, usualmente, a colheita e o beneficiamento são manuais, devido à escassez de máquinas para este fim, o que tem sido um dos entraves para a produção em larga escala.

Pode ser cultivada durante o ano todo, porém desenvolve-se melhor e é mais produtiva quando cultivada no inverno, sendo inclusive resistente à geadas leves. Embora sendo pouco exigente a solos, é uma planta sensível à falta de água e mesmo curtos períodos de estiagem comprometem a sua produtividade, razão pela qual o produtor de calêndula deve dispor de equipamento de irrigação (MONTANARI JUNIOR, 2004).

A calêndula começa a florir aos 90 dias após a semeadura e atinge o máximo de produção aos 120 dias. O período de colheita pode durar até 60 dias aproximadamente, após o que a planta entra em declínio. A produção esperada na safra fica em torno de 1500 kg, podendo chegar a 2000 kg/ha de flores secas.

2.2 Metabolismo Secundário em Plantas

O valor intrínseco de uma planta medicinal está no seu efeito terapêutico. A Organização Mundial de Saúde estabelece que planta medicinal é qualquer planta que possui em um ou em vários de seus órgãos substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos.

As funções fisiológicas dos princípios ativos nas plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da planta contra agentes externos como

doenças, pragas ou à resíduos do metabolismo vegetal. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos (quase todos) pelo metabolismo secundário das plantas (MARTINS et al., 2000). Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, intensidade de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

Este metabolismo não é essencial para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas é essencial para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema. A produção de princípios ativos não tem um custo metabólico excessivo para a planta e trouxe para ela uma vantagem adaptativa. Portanto, o metabolismo secundário é responsável pelas relações entre o indivíduo e o ambiente onde ele se encontra e, por causa do seu caráter adaptativo, pode ser manipulado (MONTANARI JUNIOR, 2004).

O clima exerce uma influência direta sobre a vegetação, assim como uma influência indireta, via solo. As informações obtidas dos diversos estudos fitoquímicos realizados sugerem que a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários é suscetível à variação sazonal, geográfica e talvez até circadiana, apesar desta hipótese não ter sido ainda confirmada devido à escassez de trabalhos que enfoquem esses parâmetros (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

O fato de o metabolismo secundário ser regido pelo código genético, e este interagir com o ambiente, tem grande importância na produção de plantas medicinais, pois a qualidade do produto final é fortemente influenciada pelas técnicas de cultivo adotadas em sua produção e pelas características genéticas da população sob cultivo.

2.3 Efeito da água sobre a produção de princípios ativos

A água é um fator climático que exerce influência direta sobre desenvolvimento da planta e sua produção de princípios ativos. O teor destas substâncias pode aumentar ou diminuir de acordo com a variação deste fator (CORRÊA JUNIOR, 1994).

Sendo a água um elemento essencial para a vida e o metabolismo das plantas, supõe-se que em ambientes mais úmidos a produção de princípios ativos seja maior. Porém, nem sempre isto é verdadeiro. Alguns resultados demonstraram que os efeitos negativos nos teores de princípios ativos são devidos mais ao excesso de água do que à falta, pois algumas espécies, sofrendo estresse hídrico em determinadas fases da cultura, produziram mais substâncias do metabolismo secundário, propiciando a ação de defesa da planta. Na natureza observa-se que em períodos mais secos, algumas espécies produzem maior quantidade de frutos para poder garantir sua perpetuação, mesmo em condições adversas (FURLAN, 1998).

O lento desenvolvimento de deficiência hídrica pode induzir a um ajustamento osmótico em algumas espécies, resultando na manutenção da turgescência celular a baixos potenciais hídricos durante a condição de seca. O ajuste osmótico é um importante mecanismo de tolerância à seca, porque capacita a planta a continuar com a expansão celular, realizar ajustes estomáticos e fotossintéticos, melhorar o crescimento vegetal e ter, em alguns casos, produção rentável (KUMAR ; SING, 1998). Por outro lado, plantas irrigadas podem compensar o menor teor de princípios ativos com uma maior produção de biomassa o que resultará num maior rendimento final de princípios ativos/ área (CORRÊA JUNIOR, 1994).

Segundo English-Loeb et al. (1997) *apud* Carvalho et al. (2003), é pouco conhecida a influência do grau de umidade sobre as defesas baseadas em compostos não-nitrogenados, enquanto as defesas baseadas em compostos nitrogenados, como os alcalóides, tendem a aumentar

em resposta ao estresse hídrico. Em muitos casos, entretanto, tem sido verificado que a deficiência hídrica moderada resulta em níveis aumentados de defesas não baseadas em nitrogênio, tais como taninos, resinas e óleos essenciais.

Munnu e Singh (2004) avaliaram 3 regimes de umidade no solo (0,25 ; 0,50 e 0,75 de fração de evaporação do tanque classe A) sobre o desenvolvimento vegetativo e a produção, o rendimento e a qualidade do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). A irrigação com 0,50 de fração de evaporação do tanque classe A gerou o maior crescimento e produção de óleo, sendo que os regimes de irrigação não influenciaram o conteúdo nem a qualidade do óleo.

El-Din (2003) avaliou os efeitos de diferentes suprimentos de água (5, 10, 15 e 25 litros/lisímetro para solo arenoso e 2, 3, 4 e 5 litros/lisímetro para solo argiloso) sobre o crescimento e a produção de óleo essencial em anis (*Pimpinella anisum*). Em ambos os solos, as irrigações com 2 e 4 litros /lisímetro proporcionaram a maior produção de frutos, sendo que o déficit hídrico aumentou o conteúdo de óleo essencial nos mesmos.

Nascimento (2003) avaliou a influência do estresse hídrico sobre as trocas gasosas, e características anatômicas e fitoquímicas de plantas jovens de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). Nas plantas submetidas ao estresse severo houve uma queda significativa na fotossíntese, condutância estomática e transpiração, sendo esta redução acompanhada pelo aumento da concentração de carbono intercelular. Em geral, as maiores taxas de fotossíntese foram observadas no estresse moderado (rega a cada 5 dias a partir dos três meses de idade). Em relação ao teor de cumarina e óleo essencial foram observados os maiores rendimentos no estresse moderado e a composição química do óleo essencial não foi influenciada pelos diferentes regimes hídricos.

Egert e Tevini (2002) avaliaram os efeitos da suspensão da irrigação na planta condimentar *Allium schoenoprosom*. A condição de seca resultou em reduções significativas no conteúdo relativo de água (CRA) e na transpiração das folhas. Entretanto, as folhas não apresentaram sinais de dano oxidativo, desde que as concentrações de clorofila e proteínas solúveis assim como a extensão de peroxidação de lipídeos não foram alterados comparando-se com as plantas bem hidratadas. A concentração de carotenóides e flavonóides permaneceu estável, indicando que não houve perda da capacidade antioxidante. Embora não tenha ocorrido variação na atividade da enzima guaiacol peroxidase, a deficiência hídrica aumentou a atividade específica da ascorbato peroxidase e reduziu a atividade da lipoxigenase. Ambas alterações podem ser consideradas benéficas sob condição de seca, desde que elas potencialmente reduzem a formação de espécies reativas de oxigênio.

Segundo Carvalho et al. (2005) a diminuição na disponibilidade hídrica do substrato reduziu a porcentagem de partenólídeo em plantas de artemísia (*Tanacetum parthenium*). Segundo os autores, a redução na produção de metabólitos secundários terpenóides, em situação estressante, pode ser estratégia de sobrevivência da planta, já que, segundo Gershenzon (1994) *apud* Carvalho et al.(2005), o custo de produção de terpenóides, como o partenólídeo, é maior do que o da maioria dos metabólitos primários e secundários. Somado a isto, o custo energético de produção das enzimas biossintéticas é alto, porque estas enzimas aparentemente não são comuns a outras rotas metabólicas. À semelhança de *Cymbopogon pendulus* e *C. nardus*, as plantas de *T. parthenium* crescidas sob níveis reduzidos de água no solo, diminuem o crescimento e investem no ajuste osmótico por meio do acúmulo de prolina, por exemplo, como estratégia para se adaptar à condição de estresse hídrico (SINGH-SANGWAN; FAROOQI; SING-SANGWAN, 1994).

Zhao – Ying et al. (2002) realizaram um estudo sobre o efeito da irrigação por aspersão sobre a produção e os conteúdos de ginsenosídeos e aminoácidos em *Ginseng*. Com a aplicação de irrigação, ocorreram aumentos na produção; peso da planta ; largura das folhas, conteúdo de ginsenosídeos nas raízes, caules e folhas e conteúdo de aminoácidos.

Baricevic, Zupancic e Johnson (2002) avaliaram o impacto do estresse hídrico e/ou fertilização com nitrogênio sobre a produção e o conteúdo de metabólitos secundários em diversas espécies medicinais. Em Beladona (*Atropa beladonna* L.), a máxima produção de alcalóides tropânicos (hiosciamina e escopolamina) foi obtida em plantas mantidas sob um ótimo regime de irrigação (35% de esgotamento da capacidade de campo do solo) acompanhado por um suprimento de 0,37g de nitrogênio por vaso. Em contraste, o conteúdo máximo de alcalóides foi obtido com 95% de esgotamento da capacidade de campo somado a um suprimento de 1,6g de N/vaso.

Silva et al. (2002) estudaram as respostas biofísicas, alocação de biomassa e produção de óleo essencial em “Pimenta Longa” (*Piper hispidinervium*) mantida sob estresse hídrico e/ou fertilização. No décimo quinto dia de estresse hídrico (nos tratamentos sem irrigação), o potencial água nas plantas foi reduzido de -0,05 para -0,5 MPa, a resistência estomática foi aumentada e a fotossíntese líquida foi reduzida de 20 para cerca de $1,4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As produções de biomassa e óleo essencial foram reduzidas em 50%, quando comparadas com as plantas irrigadas e fertilizadas ; até o sétimo mês após o plantio, quando foram notadas mudanças no padrão de alocação de biomassa nos tratamentos com irrigação. Os autores concluíram que a deficiência hídrica em qualquer fase do desenvolvimento da planta afeta a produção de óleo essencial.

Ahmed e El- Hassen (2001) relataram os efeitos de regimes de irrigação (isto é, irrigação a cada 7, 14, 21 e 28 dias) sobre o desenvolvimento vegetativo e o conteúdo de alcalóides em dois cultivares de vinca (*Catharanthus roseus*). Para ambos os cultivares, a altura da planta foi significativamente reduzida com o aumento do intervalo de irrigação. Por outro lado, o número de ramos foi constantemente maior com o aumento do intervalo de irrigação, assim como a massa seca de raízes, a produção de folhas e raízes e o conteúdo de alcalóides.

Singh-Sangwan, Farooqi e Sing-Sangwan (1994) verificaram, em plantas de *Cymbopogon pendulus* expostas por 90 dias à deficiência hídrica amena (intervalo de irrigação de 2 dias) ou moderada (intervalo de irrigação de 3 dias), maior teor de óleo essencial (g/planta).

Entretanto, no que diz respeito ao teor de flavonóides nas plantas, pouco se sabe a respeito da influência de disponibilidade hídrica sobre este metabólito secundário. Na literatura são citados outros fatores ambientais que influenciam a produção de flavonóides nas plantas, como, por exemplo, infecção, temperatura, nutrição, injúria, metabolismo do açúcar e do nitrogênio e qualidade de radiação (Blank, 1947 apud Santos; Blatt, 1998). O levantamento bibliográfico não registra estudos conclusivos com *Calendula officinalis* L. relacionando a influência de agentes estressores na produção de seus compostos ativos.

2.4 Ácido abscísico e déficit hídrico em plantas

O ácido abscísico (ABA), inibidor de crescimento, é bastante conhecido como o “hormônio do estresse”, exercendo importante função na resposta da planta ao déficit hídrico, tanto ao nível da planta como um todo quanto ao nível celular (DAVIES; ZHANG, 1991). A concepção de que o ABA é um hormônio do estresse baseia-se na sua rápida e maciça acumulação

sob condições de deficiência hídrica e outros estresses ambientais, tais como temperatura reduzida e alta salinidade.

O ABA exerce vários efeitos fisiológicos sobre o desenvolvimento e diferenciação das plantas, e tem sido identificado como um mensageiro nas vias de resposta de percepção do estresse hídrico e de outros estresses ambientais. O ABA pode agir no nível molecular, celular e da planta como um todo, transformando em respostas biológicas de proteção os efeitos exercidos pelo ambiente (STACCIARINI-SERAPHIN, 2004). O papel fisiológico do ABA no estresse hídrico ocorre principalmente através da promoção do fechamento estomático. Seu sítio de ação mais provável parece situar-se na superfície externa da membrana plasmática da célula-guarda, embora evidências indiretas apontem também a existência de um receptor intracelular.

Muitos estudos têm demonstrado que a aplicação exógena de ABA em plantas sob estresse hídrico pode aumentar a sua tolerância ao estresse (YIN et al., 2004). O efeito protetor do ABA nas plantas desidratadas contribui para uma melhor adaptação à condição de falta de água a longo prazo e se dá de várias maneiras. O ABA pode atuar na diminuição da produção de novas folhas, a fim de reduzir a expansão foliar durante períodos de alta demanda transpiratória (YIN et al., 2004); na inibição do crescimento e desenvolvimento da parte aérea (SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001); na estabilidade do aparato fotossintético (GONG; LI ; CHEN, 1998); na diferenciação estomática alterada; síntese de ceras epicuticulares e indução da formação de espinhos e tricomas (SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001); além da indução da expressão de desidrinas (PELAH et al., 1997) e do aumento do conteúdo relativo de água (CRA) das plantas (JIANG ; HUANG, 2002). No caso de plantas medicinais, o ABA desencadeia mudanças no conteúdo de alguns compostos secundários tais como fenóis, taninos, prolina, poliaminas e terpenóides (LAZCANO-FERRAT ; LOVATT, 1999 ; FONSECA et al., 2006).

A pesquisa sobre o papel do ABA na comunicação raiz-parte aérea tem sido realizada mediante o suprimento de ABA exógeno para plantas inteiras, folhas destacadas ou epidermes isoladas (HECKENBERGER; SCHURR; SCHULZE, 1996). Muito se sabe sobre a função do ABA no fechamento dos estômatos, assim como a sua síntese em raízes desidratadas e circulação na planta. Entretanto, o conhecimento sobre a exata relação entre déficit hídrico e sinalização com ABA a longas distâncias ainda é limitado; assim como a natureza das interações entre o ABA e outros hormônios sinalizadores químicos, como as citocininas e o etileno (SAUTER; DAVIES; HARTUNG, 2001).

Sharp (2002), trabalhando com genótipos de milho, tomateiro e *Arabidopsis* deficientes em ABA, sugeriu que a restrição na produção de etileno pode ser uma função geral do ABA, e que, como resultado, a concentração endógena de ABA teria mais a função de manter do que de inibir o crescimento da planta. Em adição à regulação do crescimento das raízes e parte aérea, esta interação hormonal é provavelmente relevante em outras respostas ao estresse nas quais acredita-se que haja o envolvimento do etileno, como a senescência foliar e a abscisão de folhas, flores e frutos.

A sinalização química com ABA é um componente importante da resposta das plantas ao estresse, e como tal, torna-se o alvo prioritário para a manipulação genética ou agronômica (DAVIES et al., 2000).

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Estudar o efeito de diferentes intensidades de deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre as trocas gasosas da planta de calêndula.
- 2) Estudar o efeito de diferentes intensidades de deficiência hídrica e aplicação de ABA sobre a produção de flavonóides nas inflorescências de calêndula.
- 3) Verificar se a aplicação do ácido abscísico (ABA) poderá reverter ou atenuar os efeitos negativos da deficiência hídrica sobre a fisiologia da planta de calêndula, em especial sobre as trocas gasosas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização do Experimento

Esta pesquisa foi conduzida na área do Horto Experimental de Plantas (Departamento de Ciências Biológicas) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba-SP.

O experimento foi instalado em condições de casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em vasos contendo uma mistura de substrato orgânico comercial Plantmax, terra argilosa e areia (na proporção 1:1:1).

4.2 Preparo das mudas e plantio dos vasos

As mudas foram obtidas a partir de sementes comerciais de calêndula (*Calendula officinalis* L., cv. Dobrada Sortida- SEMEX), preparadas em bandejas de isopor, colocando-se duas sementes por célula, em casa de vegetação, em 08/07/05. Sete dias após a germinação foi realizado o desbaste, deixando-se uma planta por célula. Durante a formação das mudas, foram realizadas irrigações manuais diariamente. O período para a formação das mudas foi de 7 a 10 dias.

O transplante das mudas para os vasos plásticos (com diâmetro de 50 cm) foi realizado quando as mesmas apresentavam uma altura média de 15 –20 cm, em 02/08/05. Os vasos foram irrigados diariamente até a saturação do substrato durante o período de desenvolvimento vegetativo até o início do florescimento.

4.3 Tratamentos

Os tratamentos com intervalos de suspensão da irrigação foram aplicados durante o início do florescimento das plantas, em 08/09/05. Como o florescimento da calêndula não é homogêneo, a decisão pelo início dos tratamentos foi tomada em função da observação de que pelo menos 50% dos vasos estivessem com plantas apresentando o primeiro botão floral fechado.

A quantidade de água colocada em cada vaso foi estabelecida em função da capacidade de campo apresentada pelo substrato (medida pelo consumo de água), por meio da seguinte metodologia: a) preenchimento dos vasos com substrato seco ao ar, b) pesagem de vaso e substrato seco, c) umedecimento do substrato dos vasos com água até atingir o ponto de saturação, d) cobertura dos vasos com saco plástico para evitar evaporação até que cesse a drenagem natural (ponto esse que será denominado “capacidade de campo”), e) determinação da umidade à capacidade de campo por meio de pesagem do vaso e substrato e f) determinação da umidade retida no substrato, calculando-se a diferença entre as massas do substrato na capacidade de campo e seco. A quantidade de água correspondente a 100% da capacidade de campo foi aplicada aos vasos pela manhã.

Os tratamentos com deficiência hídrica foram estabelecidos seguindo um aumento gradual do intervalo de irrigação, constituindo-se de: controle (irrigação diária), suspensão da irrigação por 3 dias, suspensão da irrigação por 6 dias e suspensão da irrigação por 9 dias.

A aplicação do ácido abscísico (ABA), nas concentrações de 0 ; 10 e 100 μ M foi realizada através de pulverização em 08/09/05, juntamente com o início dos tratamentos de deficiência hídrica. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque com concentração 1mM de

ABA (Sigma - Aldrich), adicionando-se suficientes gotas de etanol 1%, completando-se em solução aquosa. As plantas foram pulverizadas no início da manhã, até o ponto de gotejamento.

Após o término dos tratamentos, foi iniciada a colheita das inflorescências, numa frequência de uma a duas vezes por semana até o final do florescimento (em 05/12/05), após o que as plantas entraram em senescência. Para a obtenção de uma matéria prima adequada, as inflorescências foram retiradas com auxílio de tesoura e com o pedúnculo o mais curto possível.

As inflorescências foram trazidas para o laboratório imediatamente após a colheita e colocadas para secar em estufa à 40° C, por um período de 2 a 3 dias. As mesmas foram acondicionadas em sacos plásticos revestidos por um saco de papel Kraft (evitando a interferência de luz e de umidade), onde permaneceram armazenadas até o momento da análise fitoquímica.

4.4 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 repetições (indivíduos) em cada tratamento. O experimento constou, portanto, de 48 plantas (12 tratamentos e 4 repetições), num esquema fatorial 4 x 3 (12 tratamentos resultantes da combinação entre quatro intervalos de irrigação e três concentrações de ABA).

Os fatores significativos pelo teste F na análise de variância tiveram suas médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 0,05 de probabilidade, através do Programa Estatístico Sisvar.

4.5 Variáveis analisadas

4.5.1 Conteúdo Relativo de Água (CRA)

O conteúdo relativo de água na folha foi determinado em quatro folhas de cada tratamento, segundo Turner (1981), pela form. (1):

$$CRA = \frac{MF - MS}{M_{sat} - MS} \times 100 \quad (1)$$

onde: MF= massa fresca , MS= massa seca e Msat= massa saturada)

As folhas foram retiradas das plantas sempre às 7 horas da manhã, nos dias de medições das trocas gasosas (correspondentes aos diferentes intervalos de suspensão da irrigação) e trazidas imediatamente para o laboratório, onde eram cortadas com vazador de cilindros. Os discos foliares foram pesados (massa fresca) e depois deixados em placa de Petri com água destilada por um período de 24 horas, para obtenção da massa saturada. Em seguida, os cilindros foram colocados em estufa à 50° C durante 2 dias e novamente pesados (massa seca).

4.5.2 Trocas Gasosas

As medidas de trocas gasosas (**A**= assimilação de CO₂ - μmol CO₂ m⁻² s⁻¹, **gs**= condutância estomática - mmol H₂O m⁻² s⁻¹, **E**= transpiração- mmol H₂O m⁻² s⁻¹ e **Ci**= concentração intercelular de CO₂ - ppm) foram realizadas com um medidor portátil de trocas gasosas por infravermelho (modelo CIRAS-2, PPSsystem, UK). A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como A/E.

Todas as medidas foram realizadas em uma folha visualmente sadia e totalmente expandida (folha ontogenicamente madura) nos quatro indivíduos de cada tratamento, após cada período de suspensão da irrigação (aos 3, 6 e 9 dias após a aplicação do déficit hídrico, conforme cada tratamento). As medições foram conduzidas sob condições naturais de temperatura, luz e umidade, no horário de luz saturante (entre 10:00 e 12:00 horas) para que a avaliação das trocas gasosas coincidissem com o período de fotossíntese máxima.

4.5.3 Teor de Flavonóides Totais

A análise química das inflorescências de calêndula foi iniciada em março de 2006 e executada no Laboratório de Botânica e Farmacognosia da Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, em Presidente Prudente/SP.

A dosagem de flavonóides foi feita de acordo com Verlag (1978) modificado, onde se utilizou quercetina como padrão, em solução de metanol (MeOH) e cloreto de alumínio. Duas gramas de material seco e pulverizado (flores tubulosas + liguladas + receptáculos) foram extraídos com 20 ml de MeOH 80% e aquecidos em banho maria à 60° C. O extrato foi filtrado para um balão volumétrico de 50 ml e repetiu-se a extração do resíduo duas vezes com 10 ml de MeOH 80%, filtrando-se e reunindo os extratos no balão, sendo o volume completado para 50 ml com MeOH 80%. Transferiu-se 5 ml para um tubo de ensaio, adicionando-se 10 ml de MeOH 100% e homogenizando-se manualmente. Finalmente uma alíquota de 2 ml foi transferida para outro tubo de ensaio e acrescentada de 2 ml de solução de cloreto de alumínio (5g de cloreto de alumínio em 100 ml de água destilada) e 6 ml de metanol 100%. Após repouso de 15 minutos, fez-se leitura a 420 nm em espectrofotômetro UV/visível Beckman DU 70 para se obter a concentração de flavonóides (µg/ml). A análise foi feita em triplicata. Os dados de absorbância

das amostras foram comparados com uma curva-padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de quercetina. A solução padrão de quercetina foi preparada com MeOH 100% numa concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$. Aliquotas de 1,0 (20 $\mu\text{g/ml}$) a 8 ml (160 $\mu\text{g/ml}$), com intervalos de 1,0 ml foram utilizadas para a confecção da curva-padrão, acrescidas de 2 ml de cloreto de alumínio e concentrações decrescentes de MeOH 100% de 8 a 1 ml.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Trocas Gasosas e Conteúdo Relativo de Água

5.1.1 Três dias de suspensão da irrigação

Aos 3 dias de suspensão da irrigação, as condições ambientais em que foram realizadas as medições eram de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) em torno de 1055,33 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura média de 33°C e déficit de pressão de vapor do ar (DPV) em torno de 1,4 kPa.

Observou-se que os parâmetros E, gs, A, Ci e EUA (Figura 1) e CRA (Tabela 1) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Com relação à temperatura da folha (TL), verifica-se que os tratamentos 5 e 6 apresentaram maiores temperaturas em relação ao controle, devido provavelmente à tendência de diminuição da gs observada nestes mesmos tratamentos. Os tratamentos controle (1, 2, 3) e o tratamento com deficiência hídrica (4) apresentaram uma tendência de menor temperatura da folha, evidenciando uma maior perda de calor latente.

Desta forma, conclui-se que a planta de calêndula não apresentou alteração nestes parâmetros sob esta intensidade de estresse hídrico (3 dias de interrupção da irrigação) e que a aplicação de ABA não proporcionou efeito significativo nas variáveis de trocas gasosas avaliadas.

Figura 1 - Efeito do déficit hídrico (3 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre a fotossíntese(A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência de uso da água (EUA) e temperatura da folha ($T^\circ\text{C}$) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Legenda:

1= Controle (irrigação diária)
 2= Controle (irrigação diária) + 10 μM ABA
 3= Controle (irrigação diária) + 100 μM ABA

4= 3 dias de suspensão total da irrigação
 5= 3 dias de suspensão total da irrigação + 10 μM ABA
 6= 3 dias de suspensão total da irrigação + 100 μM ABA

Tabela 1 - Efeito do déficit hídrico (3 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre o conteúdo relativo de água da folha (**CRA**) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Tratamentos	CRA (%)
Controle (irrigação diária)	89,37 a
Controle (irrigação diária) + 10 μ M ABA	90,30 a
Controle (irrigação diária) + 100 μ M ABA	93,47 a
3 dias de suspensão total da irrigação	88,33 a
3 dias de suspensão total da irrigação + 10 μ M ABA	93,22 a
3 dias de suspensão total da irrigação + 100 μ M ABA	91,12 a

5.1.2 Seis dias de suspensão da irrigação

Aos 6 dias de deficiência hídrica, observou-se que as variáveis Ci e EUA (Figura 2) e CRA (Tabela 2) não apresentaram diferença significativa em relação aos tratamentos com suprimento constante de água acrescidos ou não de ABA. Cabe ressaltar que nesta intensidade de estresse hídrico algumas plantas já apresentavam perda acentuada de turgescência. Provavelmente a manutenção do CRA se deu apenas pelo controle estomático da planta e pelo próprio ABA endógeno (induzido pelo déficit hídrico), sendo que a aplicação de ABA suplementar pareceu não surtir nenhum efeito. Já em relação à eficiência de uso da água (EUA), embora não tenham ocorrido variações significativas na comparação das médias, verifica-se uma tendência de aumento nos valores sob a menor concentração de ABA aplicada.

Figura 2 - Efeito do déficit hídrico (6 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre a fotossíntese(A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência de uso da água (EUA) e temperatura da folha ($T^\circ\text{C}$) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Legenda:

1= Controle (irrigação diária)
 2= Controle (irrigação diária) + 10 μM ABA
 3= Controle (irrigação diária) + 100 μM ABA

4= 6 dias de suspensão total da irrigação
 5= 6 dias de suspensão total da irrigação + 10 μM ABA
 6= 6 dias de suspensão total da irrigação + 100 μM ABA

Tabela 2 - Efeito do déficit hídrico (6 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre o conteúdo relativo de água da folha (**CRA**) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Tratamentos	CRA (%)
Controle (irrigação diária)	90,84 a
Controle (irrigação diária) + 10 μ M ABA	83,13 a
Controle (irrigação diária) + 100 μ M ABA	90,89 a
6 dias de suspensão total da irrigação	86,40 a
6 dias de suspensão total da irrigação + 10 μ M ABA	82,74 a
6 dias de suspensão total da irrigação + 100 μ M ABA	86,04 a

Esta ausência de variação significativa no CRA e EUA pode ser explicada por um ajustamento osmótico da própria planta como resposta adaptativa durante períodos de seca. Em outros estudos também se constatou que plantas submetidas a um estresse hídrico moderado geralmente apresentam um ajustamento osmótico como resposta ao estresse de grande importância para a manutenção do crescimento no período de seca, como no caso de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e acerola (*Malpighia emarginata*) (PRADO, 1991; NOGUEIRA et al., 2001).

Com relação à condutância estomática e transpiração, observou-se que somente na maior dose de ABA (100 μ M no tratamento 6) houve diminuição nos valores em relação ao controle, evidenciando o efeito do ABA de indução do fechamento estomático. Entretanto, os tratamentos 3 e 6 não diferiram entre si, evidenciando que o ABA induziu o mesmo efeito do déficit hídrico sobre a gs e que os valores de E se correlacionaram com os valores da gs, ou seja, no tratamento 6 (6 dias de suspensão da irrigação + 100 μ M ABA) a queda na gs foi acompanhada por uma queda na transpiração.

Desta forma, no tratamento 3, onde não havia limitação hídrica, o efeito estomático pode ser atribuído somente ao biorregulador; enquanto que no tratamento 6 verificou-se que o ABA intensificou o fechamento induzido pela deficiência hídrica. Ainda, de acordo com estes resultados, evidenciou-se que as plantas apresentaram os efeitos do ABA provavelmente entre o quarto e sexto dia após a sua aplicação.

Com o aumento do período de déficit hídrico e com o fechamento dos estômatos é esperada uma maior temperatura da folha (TL). De fato, de acordo com a Figura 2, a TL foi maior no tratamento 6 quando comparado com os tratamentos controle (1, 2 e 3). Ainda com relação à TL, é possível observar separadamente os efeitos do déficit hídrico e do ABA. Quando houve somente o déficit (tratamento 4), não ocorreram diferenças significativas em relação aos tratamentos controle. Porém, a imposição de estresse hídrico e aplicação de ABA às plantas (tratamento 6) resultou em aumento na TL, quando na maior concentração aplicada (100 μ M).

As condições ambientais no dia em que foram realizadas estas medições eram de céu nublado (DFFF em torno de 338 μ mol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura média de 23°C e déficit de pressão de vapor do ar (DPV) em torno de 1,2 kPa. Esta diferença das condições ambientais em relação às medições realizadas aos 3 e 9 dias de suspensão da irrigação ficou evidenciada também pelos menores valores de transpiração obtidos (média de 2,0 a 4,5) quando comparados àqueles obtidos aos 3 dias de déficit hídrico (média de 8,5 a 9,3 - Figura 1).

A fotossíntese líquida (A) nos tratamentos com deficiência hídrica foi alterada em relação aos tratamentos controle somente quando houve a adição da maior dose de ABA (tratamento 6), verificando-se um efeito claro das concentrações de ABA utilizadas (10 e 100 μ M). Para Lian, Zang e Wong (1997) é importante separar o efeito do déficit hídrico sobre a fotossíntese daquele

efeito do ABA. Neste experimento, o fechamento estomático causado pela aplicação de ABA se traduziu em diminuição na atividade fotossintética da planta somente quando a mesma se encontrava sob déficit hídrico. Tardieu, Lafarge e Simmoneau (1996) afirmaram que, para diversas espécies, a g_s foi geralmente correlacionada com o potencial hídrico da folha, sugerindo que sinais químicos entre a raiz e a parte aérea não são os únicos fatores envolvidos na condutância estomática. Os estômatos de plantas sob estresse hídrico apresentam uma maior sensibilidade ao ABA aplicado (por pulverização foliar ou através do pecíolo, via fluxo transpiratório) do que aqueles de plantas bem hidratadas (DAVIES, 1978).

A questão sobre se a limitação fotossintética nas plantas sob condição de seca ocorre devido principalmente ao fechamento estomático ou se dá através de um enfraquecimento metabólico ainda permanece em aberto (FLEXAS; MEDRANO, 2002). De maneira geral, para diferentes espécies de plantas e sob diferentes circunstâncias, a regulação dos processos fotossintéticos à condição de seca parece ser mais dependente da g_s nos estágios iniciais do estresse. Isto implica que, num primeiro momento, este ajuste fotossintético depende mais da disponibilidade de CO_2 no mesófilo (isto é, do fechamento estomático) do que do estado hídrico da folha (MEDRANO et al., 2002). Os dados obtidos neste experimento concordam com esta afirmação, onde sempre os menores valores de A correspondem aos menores valores de g_s (Figura 2).

Ainda, de acordo com Lawlor e Cornic (2002), é sabido que para a maioria das espécies a fotossíntese se torna irreversivelmente diminuída quando o conteúdo relativo de água na folha (CRA) decresce para cerca de 70% . Um CRA decrescente irá progressivamente diminuir a condutância estomática das folhas e a assimilação de CO_2 , a qual eventualmente cessa (LAWLOR, 2002 ; FLEXAS ; MEDRANO, 2002). Conseqüentemente, nas folhas de plantas C3 e

C4, assim que o CRA decresce, a relativa limitação da fotossíntese pela gs decresce também e a limitação metabólica aumenta (a medida que o estresse se torna de moderado a severo). Estas afirmações corroboram os resultados obtidos neste experimento, onde não ocorreu variação na Ci (Figura 2) e o CRA se manteve homogêneo entre os tratamentos, com valores sempre superiores a 80% mesmo aos 6 dias de suspensão total da irrigação (Tabela 2).

5.1.3 Nove dias de interrupção da irrigação

Aos 9 dias de suspensão da irrigação, as condições ambientais em que foram realizadas as medições eram de DFFF em torno de $1056 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura m\u00e9dia de 30°C e d\u00e9ficit de press\u00e3o de vapor do ar (DPV) em torno de 1,4 kPa.

De acordo com a Figura 3, verifica-se que aos 9 dias de suspens\u00e3o da irriga\u00e7\u00e3o ocorreram mudan\u00e7as dr\u00e1sticas em par\u00e2metros fisiol\u00f3gicos da planta de cal\u00e9ndula, revelando-se ser esta intensidade de defici\u00eancia h\u00eddrica testada a mais severa para esta esp\u00e9cie.

Todos os par\u00e2metros de trocas gasosas avaliados apresentaram diferen\u00e7as significativas. Nota-se claramente uma distribui\u00e7\u00e3o agrupada nas m\u00e9dias dos tratamentos controle (1, 2 e 3) e dos tratamentos com d\u00e9ficit (4, 5 e 6) com rela\u00e7\u00e3o aos par\u00e2metros E, gs, A (Figura 3) e CRA (Tabela 3), sendo que os tratamentos controle (com suprimento normal de \u00e1gua) apresentaram valores superiores aos tratamentos com defici\u00eancia h\u00eddrica.

TRATAMENTOS

Figura 3 - Efeito do déficit hídrico (9 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre a fotossíntese(A), condutância estomática (gs), transpiração (E), concentração intercelular de CO₂ (Ci), eficiência de uso da água (EUA) e temperatura da folha (T^oC) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Legenda:

1= Controle (irrigação diária)
 2= Controle (irrigação diária) + 10 μM ABA
 3= Controle (irrigação diária) + 100 μM ABA

4= 9 dias de suspensão total da irrigação
 5= 9 dias de suspensão total da irrigação + 10 μM ABA
 6= 9 dias de suspensão total da irrigação + 100 μM ABA

Com relação à transpiração e à condutância estomática, os tratamentos com irrigação (1, 2 e 3) não diferem entre si, evidenciando que a aplicação do ABA não teve efeito sobre a planta hidratada. Já os tratamentos com deficiência hídrica (4, 5 e 6) apresentaram menores valores que os irrigados. Entretanto, essa diminuição em E e g_s se deu por efeito do déficit hídrico e não do ABA, já que o tratamento 4 (apenas deficiência hídrica) não difere dos tratamentos 5 e 6 (deficiência + ABA). Nota-se apenas que no tratamento 6 houve uma tendência de maior diminuição na g_s , o que poderia ser explicado por um efeito residual da maior dosagem de ABA nas plantas. Os valores da g_s aos 9 dias de interrupção da irrigação foram menores que $50 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o que caracteriza um estado de desidratação muito severo, de acordo com a classificação de Flexas e Medrano (2002), na qual se utilizou a g_s como um parâmetro referencial para a análise dos efeitos da falta de água sobre o metabolismo fotossintético.

Estes resultados concordam com aqueles encontrados por Nascimento (2003) e Nogueira et al. (2001), onde as plantas submetidas ao estresse hídrico severo (suspensão total da irrigação até observação de murcha acentuada das folhas) apresentaram taxas de transpiração praticamente nulas no final do experimento, atribuídas aos baixos valores de potencial hídrico nestas plantas.

A resposta dos estômatos ao ABA parece não ser tão simples (HECKENBERGER; SCHURR; SCHULZE, 1996). A sensibilidade das células guarda ao ABA depende do estado hídrico da folha, entre outros fatores. O decréscimo do potencial hídrico das células da epiderme irá tornar os estômatos mais sensíveis ao ABA endógeno proveniente da corrente transpiratória (TARDIEU ; DAVIES, 1992). Entretanto, segundo estes mesmos autores, essa relação direta entre ABA e g_s nem sempre é observada em experimentos de campo e laboratório, principalmente quando se realiza o suprimento de ABA. Ainda, sugere-se que a resposta estomática ao ABA se encontraria mais relacionada ao seu fluxo no xilema do que à sua concentração ; além da

importância das condições foliares como por exemplo a observação de que o decréscimo na gs observado como reação estomática ao suprimento de ABA foi fortemente estimulado quando a folha esteve exposta às condições de baixa luminosidade (HECKENBERGER; SCHURR ; SCHULZE, 1996).

A temperatura da folha não diferiu entre os tratamentos irrigados (1, 2 e 3) , mas se apresentou menor do que aquela verificada nos tratamentos com deficiência hídrica (4, 5 e 6). A adição de ABA aos tratamentos com deficiência (5 e 6) proporcionou uma diminuição na TL em relação ao tratamento 4 (deficiência sem ABA). Esse fato pode estar relacionado com as maiores reduções na transpiração causadas pelo biorregulador, diminuindo o efeito de resfriamento. Entretanto, os valores de TL se mantiveram abaixo de 35°C mesmo com a interferência dos tratamentos e desta forma não podem ser considerados como fator limitante para as enzimas da fotossíntese.

A fotossíntese líquida (A) foi drasticamente reduzida nos tratamentos com deficiência hídrica, atingindo valores próximos de zero e coincidindo também com uma forte diminuição no CRA da folha. Nascimento (2003) relacionou o comportamento da fotossíntese durante períodos de seca em função do balanço hídrico, ou seja, com a evolução do estresse hídrico, tanto a fotossíntese quanto a condutância estomática decaíram progressivamente acompanhando a queda de potencial hídrico da planta. Novamente, a aplicação de ABA não resultou em alteração da fotossíntese tanto nos tratamentos controle com irrigação diária (1, 2 e 3) como nos tratamentos com deficiência hídrica (4,5 e 6). Este padrão de resposta concorda com aquele observado por Ward e Bunce (1987).

Contrapondo-se os dados de condutância estomática (g_s), temperatura da folha (TL) e fotossíntese líquida (A), pode-se dizer que em geral elevados valores de g_s proporcionaram valores elevados de A. Contudo, para a característica TL, as relações com g_s foram inversas, evidenciando a fundamental função do processo transpiratório no resfriamento foliar.

Os valores de C_i se mantiveram semelhantes ao controle (com exceção do tratamento 6, onde ocorreu um aumento neste valor, atingindo uma concentração máxima no dia de estresse mais severo), demonstrando-se que havia CO_2 disponível para a realização de fotossíntese e portanto não foi este o fator limitante para a sua realização. Segundo Lawlor (2002), a inibição do metabolismo em plantas sob estresse hídrico que ocorre como consequência de uma menor concentração de CO_2 no espaço intercelular (C_i) ou no estroma do cloroplasto, seria um efeito secundário. Primariamente, esta limitação é uma consequência da menor síntese de ATP pela enzima ATPase, a qual por sua vez é desencadeada pelo decréscimo no CRA. Se a síntese de ATP é prejudicada, a regeneração da RuBP também se torna reduzida. Desta forma, uma limitação metabólica da fotossíntese é normalmente observada e correlacionada com a perda de ATP, a qual se inicia com um estresse hídrico moderado (FLEXAS ; MEDRANO, 2002); quando as mudanças na g_s ainda são pequenas.

Ainda, segundo Kaiser (1987), sob condições de estresse hídrico a C_i geralmente permanece alta ou pelo menos maior do que aquela esperada quando ocorre decréscimo na fotossíntese e na condutância estomática. Esse acréscimo na C_i , frequentemente observado nos estágios mais avançados do estresse hídrico, indica a predominância de limitações não estomáticas à fotossíntese à medida que o estresse se torna mais severo.

No tratamento 6, onde a concentração intercelular de CO_2 (Ci) foi maior do que no controle (tratamento 1), verificou-se uma fotossíntese nula. De um modo geral, sob baixos valores de potencial de água na folha, quando a condutância estomática diminui, um aumento na concentração de Ci pode ser detectado. Este comportamento foi observado com acentuada nitidez em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt.) (NASCIMENTO, 2003; OLIVEIRA et al., 2002). Sugere-se que o aumento da concentração interna de CO_2 , sob baixos valores de potencial hídrico foliar, pode estar relacionado com uma redução dos mecanismos de assimilação de CO_2 e com um decréscimo na eficiência de carboxilação, dada pela relação A/Ci (GOMES et al., 2003).

Destaca-se a fotorrespiração como provável (mas não exclusiva) fonte de geração deste CO_2 . A fotorrespiração exerce uma importante função de proteção nas folhas de plantas C_3 sob estresse por ser uma rota para o consumo da energia excedente (isto é, não utilizada para a assimilação de CO_2). Mas à medida que ocorre um maior decréscimo no CRA, a liberação de CO_2 de origem não fotorrespiratória (isto é, proveniente da não fixação fotossintética) se torna relativamente alta, levando a uma maior Ci (LAWLOR, 2002).

A eficiência de uso da água (EUA) foi menor nos tratamentos com deficiência (4, 5 e 6), mas somente quando comparados ao controle sem adição de ABA (tratamento 1). A assimilação de CO_2 e a condutância foram diminuídas proporcionalmente (como pode ser observado em todos os tratamentos) - Figura 3, como causa do menor CRA. Entretanto, segundo Lawlor (2002), sob baixos valores de CRA, enquanto a g_s atinge seu mínimo a fotossíntese pode continuar a diminuir.

Tabela 3 - Efeito do déficit hídrico (9 dias após a suspensão total da irrigação) e aplicação de ABA sobre o conteúdo relativo de água da folha (**CRA**) de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2007. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

Tratamentos	CRA (%)
Controle (irrigação diária)	76,77 a
Controle (irrigação diária) + 10 μ M ABA	84,61 a
Controle (irrigação diária) + 100 μ M ABA	83,08 a
9 dias de suspensão total da irrigação	52,77 b
9 dias de suspensão total da irrigação + 10 μ M ABA	46,70 b
9 dias de suspensão total da irrigação + 100 μ M ABA	45,96 b

Os valores de conteúdo relativo de água na folha (Tabela 3) apresentaram diminuições significativas quando se realiza a comparação entre os tratamentos com deficiência (4, 5 e 6) e os tratamentos irrigados (1, 2 e 3), sendo que a aplicação de ABA não interferiu neste padrão de comportamento. As plantas submetidas à deficiência hídrica apresentavam-se com perda total de turgescência (com um CRA entre 46 e 52%), indicando que o regime de irrigação afetou o estado hídrico das mesmas. Estes resultados diferem daqueles relatados por Jiang e Huang (2002), onde os autores sugerem que ocorra um aumento da tolerância à seca pela aplicação de ABA, uma vez que as plantas tratadas mantiveram um maior CRA quando comparadas com plantas sem ABA.

Finalmente, concluiu-se que o efeito do ABA sobre as plantas se iniciou apenas após o terceiro dia da sua aplicação e provavelmente se manteve durante um período de tempo de 3 a 4 dias. Esta observação fica clara quando se verificam resultados significativos para todas as variáveis de trocas gasosas analisadas apenas aos 9 dias de suspensão de irrigação (Figura 3), contrapondo-se à falta de efeitos aos 3 dias (Figura 1) e aos efeitos moderados aos 6 dias (Figura 2). Portanto, as diminuições na fotossíntese e transpiração observadas aos 6 dias de deficiência

hídrica foram resultantes da diminuição da gs causada pelo ABA (somente na sua maior dosagem – 100 μ M) ; enquanto que as diferenças observadas aos nove dias foram exclusivamente causadas pela deficiência hídrica. Esse resultados concordam com a afirmação de Heckenberger, Schurr e Schulze (1996) de que a manutenção de uma baixa gs seria dependente de um suprimento contínuo de ABA à folha.

Isto leva a crer que a aplicação exógena de ABA nas plantas de calêndula levou no mínimo 4 dias para iniciar as interferências significativas nas trocas gasosas, sendo que seus efeitos prolongaram-se por no máximo 8 dias após a aplicação. Desta forma, seria necessária a realização de mais de uma pulverização para que os efeitos de proteção ou reversão do estresse hídrico pudessem ser observados. Para alguns autores, o método de aplicação do ABA nas plantas, via pulverização foliar como no caso deste experimento ou via xilema (corrente transpiratória), também tem fundamental importância na distribuição da solução no interior da lâmina foliar.

Sugere-se que a resposta estomática é dependente do carregamento de ABA no interior da folha (apoplasto) e não somente das concentrações de ABA aplicadas (HECKENBERGER; SCHURR; SCHULZE, 1996). Uma vez no interior da folha, o ABA aplicado pode ser rapidamente removido ou metabolizado nos sítios receptores. A remoção de ABA se daria tanto pelo armazenamento nas células do mesófilo após seu catabolismo (ZEEVAART; CREELMAN, 1988) como pela sua exportação para o floema (HENSON et al., 1986).

Além disso, torna-se importante salientar que a maioria das respostas espécie-específicas do aparato fotossintético de plantas ao estresse hídrico são mimetizadas pela aplicação de ABA em folhas intactas de plantas bem hidratadas. Isto sugere uma forte evidência de que é mesmo o ABA endógeno o responsável por intermediar as respostas fotossintéticas da planta ao estresse

hídrico. Quando a deficiência hídrica na folha realmente se desenvolve, o seu efeito direto sobre a fotossíntese (ou seja, independente do ABA endógeno) é amplamente dependente da tolerância da espécie em questão.

Segundo Creelman et al. (1990), a habilidade do ABA de causar o fechamento estomático é bem conhecida. A ação do ABA é rápida e baseia-se na alteração do transporte H^+/K^+ nas células guarda. Porém, quando o estresse se torna mais severo, a correlação entre o conteúdo de ABA e a gs não pode ser estabelecida (CORREIA; PEREIRA, 1995). Somente uma pequena fração deste ABA acumulado é necessária para que ocorra o fechamento, sendo ainda que este fechamento estomático se dá antes da total elevação na concentração do ABA. Nenhuma função tem sido descrita para este ABA excedente, mas uma possibilidade é a de que ele possa aliviar alguns dos efeitos deletérios do déficit hídrico.

Finalmente, torna-se necessário destacar que após o término do intervalo de suspensão da irrigação, as plantas foram irrigadas e recuperaram a turgescência rapidamente (a irrigação foi realizada no período da manhã, após a finalização das medidas de trocas gasosas de cada tratamento, sendo que na tarde do mesmo dia as mesmas já se apresentavam túrgidas novamente). Discute-se qual é o limite máximo de diminuição no CRA ocasionador de uma redução irreversível na fotossíntese da maioria das espécies. Este valor é apontado como CRA 50% (KAISER, 1987) ou CRA 70% (LAWLOR; CORNIC, 2002). Nas condições deste experimento, o estado hídrico das plantas aos 9 dias de interrupção da irrigação ficou entre 46 a 52% e mesmo assim, após reidratadas, as plantas mantiveram o processo de florescimento até o final do ciclo (senescência), indicando ausência de danos irreversíveis à fotossíntese.

Embora não tenham sido realizadas medidas de trocas gasosas para se avaliar a recuperação das plantas que passaram por deficiência hídrica, é possível afirmar que a calêndula tem a capacidade de recuperar, em um curto espaço de tempo, seus mecanismos fisiológicos. A eficiência do processo de reidratação nessas plantas é responsável pela rápida recuperação das mesmas.

5.2 Teor de Flavonóides Totais

Estudos recentes têm indicado que plantas de qualidade podem ser obtidas por meio de sistemas de reduzida irrigação (MORVANT; DOLE; COLE., 1998). A deficiência de umidade altera vários processos bioquímicos e fisiológicos, e induz respostas metabólicas como o acúmulo de solutos e substâncias antioxidantes e expressão de genes específicos ao estresse (SING-SANGWAN; FAROOQI; SING-SANGWAN, 1994). Algumas mudanças podem causar injúrias às plantas, no entanto outras ocorrem enquanto a planta ajusta-se fisiologicamente ao estado de menor disponibilidade de água.

Detalhes significativos das respostas fisiológicas e metabólicas das culturas agrícolas a ambientes secos são conhecidos, mas o estudo sobre o comportamento das plantas medicinais e aromáticas com limitada disponibilidade de umidade é recente. Os efeitos são variáveis de acordo com a espécie, tecido, idade da planta e tipo de metabólito secundário; havendo também dependência da natureza, duração e intensidade da condição estressante (LETCHAMO; GOSSELIN, 1996; CARVALHO et al., 2005). Desta maneira, o estresse pode induzir mudanças

nas atividades das enzimas do metabolismo secundário e rotas metabólicas podem ser ativadas e/ou inativadas em cada situação.

Há argumentos para a hipótese de que a resposta ao estresse hídrico poderia ocorrer passivamente, desde que as plantas são rápidas em reduzir a taxa de crescimento em condição de estresse moderado, enquanto as taxas de fotossíntese seriam mantidas. Conseqüentemente, haveria acúmulo de carboidratos, que podem ser convertidos em substâncias de defesa. Segundo English-Loeb et al. (1997) *apud* Carvalho et al. (2005), estresses mais severos podem causar redução no teor de metabólitos secundários relacionados à defesa, bem como no crescimento e na fotossíntese, enquanto que estresses mais amenos podem ter conseqüências diferentes.

No que diz respeito ao efeito da água sobre a formação de compostos fenólicos na planta (entre eles, os flavonóides), pouco é sabido. Em geral, o estresse hídrico pode promover aumento na biossíntese de compostos fenólicos e formação de lignina (MATERN; GRIMMIG, 1994). De acordo com Kurup, Nalwadi e Basarkar (1994), houve aumento no teor de fenóis totais em plantas de *Tagetes erecta* L. em resposta ao estresse hídrico. Os autores sugerem que um aumento na atividade da enzima peroxidase acelera a biossíntese de certos compostos fenólicos. Em conseqüência, um aumento no teor de fenóis leva à biossíntese de lignina, a qual por sua vez reduz a perda de água dos tecidos e protege a planta do estresse hídrico.

Os mecanismos pelos quais o estresse hídrico regula a biossíntese de compostos fenólicos são desconhecidos, mas provavelmente envolvem um acúmulo diferencial de mRNA, induzindo a uma expressão gênica modificada, conforme observado em tratamentos de estresse térmico (frio) em fenótipos de *Arabidopsis* (JUNG; LEE; LEE, 2003).

Embora exista um grande número de estudos recentes sobre os efeitos do estresse hídrico na expressão gênica e regulação de fatores de transcrição em diferentes plantas, há pouca informação disponível a respeito dos efeitos de estresses ambientais sobre a produção de compostos químicos em calêndula (*C. officinalis* L.)

As flores liguladas de calêndula (*C. officinalis*) apresentam principalmente óleo essencial, carotenóides, flavonóides, mucilagens, saponinas, cumarinas, resinas e princípio amargo (LORENZI; MATOS, 2002). Entretanto as farmacopéias estabelecem que a sua avaliação farmacognóstica deve ser feita em função do teor de flavonóides totais, provavelmente por ser este o ativo com efeito terapêutico encontrado em maior concentração nesta espécie.

Neste trabalho, o teor de flavonóides totais das flores pulverizadas situou-se entre 0,30 a 0,40% (Tabela 4). Embora monografias da OMS (WHO, 2002) descrevam que a espécie *C. officinalis* não deve apresentar menos que 0,4% de flavonóides totais (calculados como hiperosídeo), os resultados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados na literatura em outros experimentos realizados com calêndula (LEITE et al., 2005). Ainda, de acordo com ZAMPRONIO¹, pela experiência e acompanhamento do mercado brasileiro, pode-se afirmar que a grande maioria da matéria prima vegetal proveniente de plantas de calêndula apresenta teor de flavonóides entre 0,05 e 0,1%. Desta maneira, uma droga que apresente mais que 0,1% é definida como sendo de qualidade. Vale observar também que os resultados deste trabalho são de flavonóides totais expressos em quercetina e não em hiperosídeo.

---

¹ ZAMPRONIO, F. Grupo Centroflora.

TABELA 4 - Efeito do déficit hídrico e aplicação de ABA sobre o teor de flavonóides totais (% na matéria seca) em inflorescências de *Calendula officinalis* L. ESALQ, Piracicaba-SP, 2005. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey à 5%

<u>Intensidade de deficiência hídrica</u>	<u>Teor de flavonóides totais (µg/ml)</u>
Controle	0,27 ab
3 dias sem irrigação	0,29 ab
6 dias sem irrigação	0,28 ab
9 dias sem irrigação	0,32 a
Controle + 10µM ABA	0,12 c
Controle + 100µM ABA	0,16 c
3 dias sem irrigação + 10µM ABA	0,17 c
3 dias sem irrigação + 100 µM ABA	0,15 c
6 dias sem irrigação + 10µM ABA	0,18 c
6 dias sem irrigação + 100µM ABA	0,18 c
9 dias sem irrigação + 10µM ABA	0,20 bc
9 dias sem irrigação + 100µM ABA	0,18 c

De acordo com a Tabela 4, verifica-se que não houve diferença significativa entre as diferentes intensidades de deficiência hídrica testadas (3, 6 e 9 dias de interrupção da irrigação) e o tratamento controle (plantas irrigadas) com relação ao teor de flavonóides totais em inflorescências de calêndula. Desta maneira, a espécie *C. officinalis* ‘Dobrada Sortida’ mostrou ser tolerante à imposição de estresse hídrico, desde que a concentração de flavonóides permaneceu estável. Mesmo tendo ocorrido um efeito prejudicial do estresse sobre as variáveis de trocas gasosas analisadas, as plantas recuperaram totalmente sua turgescência dentro de um

período de menos de 24 horas após a reidratação e a produção de flavonóides totais não foi alterada. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Egert E Tevini (2002) em *Allium schoenoprosom*, onde a condição de seca resultou em reduções significativas no conteúdo relativo de água (CRA) e na transpiração das folhas, mas não houve sinal de dano oxidativo, desde que as concentrações de clorofilas e proteínas solúveis não foram alteradas comparando-se com as plantas bem hidratadas. Os teores de carotenóides e flavonóides permaneceram estáveis, indicando que não houve perda da capacidade antioxidante.

Ao nível fisiológico, sugere-se que o estresse pode atuar redirecionando o carbono fixado fotossinteticamente da síntese de metabólitos primários tais como celulose, lipídeos e proteínas (os quais são associados ao metabolismo de crescimento) para a síntese de metabólitos secundários como flavonóides e outros compostos fenólicos (com pouca ou nenhuma influência sobre o crescimento da planta), sob condições de estresses abióticos (KIRAKOSYAN et al., 2004; ABREU; MAZZAFERA, 2005). Assim, para a planta de calêndula, sugere-se que as intensidades de deficiência hídrica testadas neste experimento não foram suficientes para promover esse redirecionamento do carbono fixado.

É sabido que a rota metabólica de produção de flavonóides é regulada em várias de suas etapas tanto por radiação UV quanto pelo nível nutricional do solo (LAVOLA et al. 2003), sendo que outros fatores também podem influenciar o seu acúmulo dentro da planta. Gray et al. (2003) concluíram que, embora um estresse hídrico breve tenha aumentado significativamente a produção de hipericina, rutina, hiperosídeos e quercetina em flores de erva-de-são-joão (*Hipericum perforatum* – Guttiferae), a época de colheita foi o fator determinante para a concentração final de fitoquímicos nesta espécie. Santos e Blatt (1998) verificaram que o perfil quantitativo de flavonóides e fenóis em flor-de-são-joão (*Pyrostegia venusta* Miers. -

Bignoniaceae) não foi influenciado por diferenças de ambiente (cerrado e mata) e tampouco por diferenças edáficas; sugerindo que a espécie não apresenta plasticidade fenotípica baseada nestes caracteres.

Entretanto, nota-se que houve uma tendência de ocorrer um aumento na porcentagem de flavonóides no maior período de deficiência hídrica (9 dias de suspensão da irrigação- Tabela 4). Sendo assim, não deve ser descartada a hipótese de que um maior período de estresse hídrico (superior a 9 dias) poderia proporcionar aumentos no teor de flavonóides totais nas inflorescências de calêndula.

Os trabalhos encontrados na literatura que avaliaram a deficiência hídrica em relação à produção de flavonóides (LAVOLA et al., 2003; GRAY et al., 2003) sugerem que as variações encontradas são não somente quantitativas como também qualitativas (composto-específicas). Kirakosyan et al. (2004), avaliando os efeitos de estresses ambientais sobre os níveis de polifenóis em folhas de *Crataegus laevigata* e *C. monogyna* (duas espécies medicinais utilizadas para tratamento de doenças do coração), verificaram que as respostas foram diferentes entre as espécies e entre os compostos. No caso dos flavonóides, em *C. laevigata* a aplicação de estresse hídrico resultou em aumento somente nas concentrações de vitexina, hiperosídeo e rutina, enquanto que o nível de acetil-vitexina-2''- O-raminosídeo decresceu mais de 50% e para outros flavonóides representativos não houve mudanças significativas. Para *C. monogyna* não foram observadas alterações importantes no teor de flavonóides na comparação entre plantas controle e plantas que sofreram estresse hídrico.

Desta maneira, pode-se dizer que existe considerável variação inter e intra clonal na produção de fitoquímicos em espécies medicinais. No caso específico de plantas produtoras de

flavonóides, as respostas são variáveis de acordo com as diferentes classes deste composto, tornando-se necessária a realização da análise de variação qualitativa, a qual não foi efetuada nesta pesquisa. Portanto, apesar da falta de resultados significativos obtidos com a calêndula utilizada ('Dobrada Sortida'), não se pode atribuir o mesmo padrão de resposta para todas as variedades da espécie. Desde que houve tendência de haver um aumento no teor de flavonóides totais na maior intensidade de deficiência hídrica, seria possível a obtenção de resultados significativos em outras variedades da espécie.

A aplicação conjunta de deficiência hídrica e ácido abscísico (ABA) em plantas de calêndula alterou significativamente a porcentagem de flavonóides totais nas inflorescências (Tabela 4). Verificou-se que o ABA provocou uma diminuição de até 50% no teor de flavonóides, para todas as intensidades de deficiência hídrica testadas (3, 6 e 9 dias de interrupção da irrigação). Este efeito de redução foi independente da concentração utilizada (10 e 100 μM), ou seja, não houve diferença significativa com relação aos teores de flavonóides entre as duas concentrações. O efeito deste biorregulador também foi independente do estresse hídrico, já que as plantas controle (com irrigação diária) também apresentaram teores reduzidos de flavonóides totais.

Durante o estresse hídrico ocorre a expressão de genes específicos induzidos pelo ABA. Eles incluem os genes que codificam as proteases, as chaperonas, as proteínas LEAs, as enzimas do metabolismo de açúcares e outros solutos osmoticamente ativos, as proteínas de canais de íons e de água, as enzimas que destoxificam espécies reativas de oxigênio e as proteínas reguladoras, como os fatores de transcrição e proteínas quinases (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

Em geral, as respostas ao ABA parecem ser reguladas por mais de uma via de transdução de sinal, mesmo em um único tipo de célula. Essa redundância é coerente com a capacidade das

células vegetais em responderem a múltiplos estímulos sensoriais. Existem evidências genéticas para o “cruzamento” entre a via de sinalização do ABA e a via de sinalização de outras classes de hormônios vegetais, bem como de açúcares (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

Seguindo-se este raciocínio de “cruzamento” entre vias de sinalização é possível sugerir que o metabolismo secundário pode ser regulado pelo ABA. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, existe uma indicação de que o ABA está direta ou indiretamente envolvido na biossíntese de flavonóides, interferindo de maneira negativa na acumulação deste metabólito secundário.

Aumentos nos teores de ABA podem desencadear uma sinalização no sentido de restringir a ação de enzimas relacionadas com a síntese de flavonóides, diminuindo sua concentração. Cho e Harper (1993) relatam que a aplicação exógena de ABA resultou em um decréscimo nas concentrações de três isoflavonóides envolvidos na indução de nodulação em mutantes de soja. Graham & Graham (1996) concluíram que o ABA pode atuar como um supressor do metabolismo de fenilpropanóides em soja. A via metabólica dos fenilpropanóides produz diversos compostos fenólicos derivados da fenilalanina, entre eles os flavonóides.

Sugere-se que entre os genes que podem ter sua expressão regulada pelo ABA estariam aqueles que codificam os passos iniciais da biossíntese de fenilpropanóides. Estes genes têm sido estudados em detalhe devido à suas respostas aos estímulos ambientais (tais como luz) e ataque de patógenos (DAVIES; SCHWINN, 2003). O acúmulo destas substâncias ocorre em parte devido a regulação da transcrição do gene que codifica a chalcona sintase (CHS), uma enzima que catalisa o primeiro passo relacionado à biossíntese de flavonóides (HEMM et al., 2004). A enzima CHS é

necessária para que haja formação de importantes flavonóides, tais como antocianinas, flavonóis, taninos condensados e isoflavonóis.

Além da ação da CHS, para que haja biossíntese de flavonóides é necessária a atuação de uma outra importante enzima (CASTRO; KLUGE; PERES, 2005). Trata-se da fenilalanina amônia liase (PAL). Essa enzima catalisa a reação de eliminação de uma molécula de amônia da fenilalanina para formar o ácido cinâmico. A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais e infecção por fungos. A PAL está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. O ponto de controle está no início da transcrição do mRNA, ou seja, a invasão de fungos desencadeia a transcrição de mRNA que codifica a PAL, aumentando a quantidade desta enzima na planta e consequentemente estimulando a síntese de compostos fenólicos. Existem muitos genes que codificam esta enzima, por isto a regulação da sua atividade é complexa (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

Finalmente, deve-se comentar que um dos principais efeitos fisiológicos da aplicação exógena de ABA nas plantas é a mudança no padrão de alocação de carbono, ocorrendo maior alocação de matéria seca para as raízes em detrimento da parte aérea. Isto leva a uma redução no desenvolvimento das folhas e a um aumento significativo da relação raiz/parte aérea; sendo que estas respostas ocorrem tanto em plantas bem hidratadas como em plantas sob estresse hídrico (YIN et al., 2004).

Desta forma, o fato desta mudança na alocação de biomassa induzida pelo ABA ter ocorrido em um momento de grande demanda de carboidratos (a imposição do estresse hídrico com aplicação conjunta de ABA ocorreu no início do florescimento) pode ter prejudicado a

formação de flavonóides nas inflorescências, contribuindo para a obtenção dos teores reduzidos deste metabólito nas plantas tratadas com ABA.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos neste experimento, concluiu-se que:

- A) A suspensão da irrigação afetou significativamente as trocas gasosas das plantas de calêndula somente após os 6 dias de interrupção da irrigação.
- B) A aplicação exógena de ácido abscísico (ABA) teve o efeito principal de causar diminuição na condutância estomática (gs) somente das plantas sob deficiência hídrica, acompanhada de uma redução da fotossíntese líquida (A). As plantas bem hidratadas não apresentam variações significativas em resposta à aplicação de ABA.
- C) As variações de trocas gasosas observadas aos 6 dias de interrupção da irrigação foram induzidas pelo ABA exógeno, enquanto que as diferenças observadas aos 9 dias são causadas pela deficiência hídrica.
- D) A aplicação de ABA não promoveu efeitos de proteção ou atenuação sobre as trocas gasosas das plantas sob deficiência hídrica.
- E) As diferentes intensidades de deficiência hídrica testadas não provocaram alteração significativa no teor de flavonóides totais das inflorescências de calêndula.
- F) A aplicação exógena de ABA resultou em uma diminuição no teor de flavonóides totais tanto nas plantas controle como naquelas submetidas ao estresse hídrico, sugerindo que este biorregulador restringe a rota biossintética deste metabólito secundário.

REFERÊNCIAS

ABREU, I.N. ; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 3, p. 241-248, 2005.

AHMED, A.A.M. ; EL-HASSEN, G.M. Effect of water regime and cultivar on herbage yield and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, Lucknow, v. 23, n. 3, p. 350-356, 2001.

BARICEVIC, D. ; ZUPANCIC, A ; JOHNSON, C.B. The impact of drought stress and/or fertilization in some medicinal plants. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, Binghamton, v. 9, n. 23, p. 53-64, 2002.

CARVALHO, L.M. ; CASALI, V.W.D. ; SOUZA, M.A. ; CECON, P.R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 726-730, 2003.

CARVALHO, L.M. de ; CASALI, V.W.D. ; SOUZA, M.A. ; BARBOSA, L.C. A. ; CECON, P.R. Crescimento, teor de partenólídeo e de prolina em plantas de *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip crescidas em substrato com diferentes teores de umidade. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 151-157, 2005.

CASTRO, P.R.C. ; KLUGE, R.A. ; PERES, L.E.M. **Manual de fisiologia vegetal**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 651 p.

CHAVES, M.M. ; PEREIRA, J.S. ; MAROCO, J. ; RODRIGUES, M.L. ; RICARDO, C.P.P. ; OSÓRIO, M.L. ; CARVALHO, I. ; FARIA, T. ; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 907-916, 2002.

CHO, M.J. ; HARPER, J.E. Effect of abscisic acid application on root isoflavonoid concentration and nodulation of wild-type and nodulation-mutant soybean plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 153, n.1, p. 145-149, 1993.

CORNIC, G. ; GHASHGHAIE, B. ; G. ; BRIANTAIS, J.M. Leaf photosynthesis is resistant to a mild drought stress. **Photosynthetica**, New York, v. 27, n.3, p. 295-309, 1992.

CORRÊA JUNIOR, C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.

CORREIA, M.J. ; PEREIRA, J.S. The control of leaf conductance of white lupin by xylem ABA concentration decreases with the severity of water deficits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 101-110, 1995.

CREELMAN, R.A. ; MASON, H.S. ; BENSON, J. ; BOYER, J.S. ; MULLET, J.E. Water deficit and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, p. 205-214, 1990.

DAVIES, K.M. ; SCHWINN, K. Transcriptional regulation of secondary metabolism. **Functional Plant Biology**, Victoria, n. 30, p. 913-925, 2003.

DAVIES, W.J. Some effects of abscisic acid and water stress on stomata of *Vicia faba* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 175-182, 1978.

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

DAVIES, W.J. ; BACON, M.A. ; THOMPSON, D.S. ; SOBEIH, W. ; RODRIGUEZ, L.G. Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plant's chemical signaling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1617-1626, 2000.

EGERT, M. ; TEVINI, M. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 43-49, 2002.

EL-DIN, A.A.E. Growth, yield and essential oil of anise in relation to water supply. **Annals of Agricultural Science**, Cairo, v.48, n. 2, p. 777-785, 2003.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and no-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 183-189, 2002.

FONSECA, J.M. ; RUSHING, J.W. ; RAJAPAKSE, N.C. ; THOMAS, R.L. ; RILEY, M.B. Potential implications of medicinal plant production in controlled environments: the case of feverfew (*Tanacetum parthenium*). **HortScience**, St. Joseph, v. 41, n. 3, 2006.

FURLAN, M.R. **Cultivo de Plantas Medicinais**. Cuiabá: SEBRAE, 1998. 137 p. (Coleção Agroindústria, 13).

GOMES, M.M.A. ; LAGÔA, A.M.M.A. ; MACHADO, E.C. ; MEDINA, C.L. Absciscic acid and indole 3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella fastidiosa* and submitted to cycles of water stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 263-270, 2003.

GONG, M. ; LI, Y.L. ; CHEN, S.Z. Absciscic acid-induced thermotolerance in maize seedling is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 153, p. 488-496, 1998.

GRAHAM, T.L. ; GRAHAM, M.Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. Dissection of primary, secondary and conditioning effects of light, wounding and elicitor treatments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 1123-1133, 1996.

GRAY, D.E. ; PALLARDY, S.G. ; GARRETT, H.E. ; ROTTINGHAUS, G.E. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of St. John's wort leaves and flowers. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 1024-1030, 2003.

GERSHENZON, J. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. **Journal of Chemistry and Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1281-1328, 1994. Abstract.

HECKENBERGER, U. ; SCHURR, U. ; SCHULZE, E-D. Stomatal response to absciscic acid fed into the xylem of intact *Helianthus annuus* (L.) plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 302, p. 1405-1412, 1996.

HEMM, M.R. ; RIDER, S.D. ; OGAS, J. ; MURRY, D.J. ; CHAPPLE, C. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 765-778, 2004.

HENSON, I.E. ; MAHALAKSHMI, V. ; ALAGARWAMY, G. ; BIDINGER, F.R. Regulation of absciscic acid concentration in leaves of field-grown pearl millet (*Pennisetum americanum* [L.] Leeke): the role of absciscic acid export. **New Phytologist**, Cambridge, v. 102, p. 249-59, 1986.

JIANG, Y. ; HUANG, B. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. **Crop Science**, Madison, n. 42, p. 202-207, 2002.

JUNG, S.H. ; LEE, J.Y. ; LEE, D.H. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 553-567, 2003.

KAISER, W.M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 71, p. 142-150, 1987.

KIRAKOSYAN, A. ; KAUFMAN, P. ; WARBER, S. ; ZICK, S. ; AARONSON, S.B.; CHANG, S.C. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, p. 182-186, 2004.

KUMAR, A. ; SINGH, D.P. Use of physiological indices as a screening technique for drought to tolerance in oilseed *Brassica* species. **Annals of Botany**, London, v. 81, p. 413-420, 1998.

KURUP, S.S. ; NALWADI, U.G. ; BASARKAR, P.W. Phenolic biosynthesis in relation to moisture stress in marigold (*Tagetes erecta* L.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 381, p. 489-493, 1994.

LAZCANO-FERRAT, I. ; LOVATT, C.J. Relationship between relative water content, nitrogen pools, and growth of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 467-475, 1999.

LAVOLA, A. ; APHALO, P.J. ; LAHTI, M. ; JULKUNEN-TIITTO, R. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scots pine. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 49-60, 2003.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water- stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 871-885, 2002.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell Environment**, Logan, v. 25, p. 275-294, 2002.

LEITE, G.L.D. ; ARAÚJO, C.B.O.; AMORIN, C.A.D. ; PÊGO, K.P. ; MARTINS, E.R.; SANTOS, E.A.M. Níveis de adubação orgânica na produção de calêndula e artrópodes associados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 227-233, 2005.

LETCHAMO, W. ; GOSSELIN, A. Transpiration, essential oil glands, epicuticular wax and morphology of *Thymus vulgaris* are influenced by light intensity and water supply. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 71, p. 123-134, 1996.

LIANG, J. ; ZHANG, J. ; WONG, M.H. Can stomatal closure caused by xylem ABA explain the inhibition of leaf photosynthesis under soil drying? **Photosynthesis Research**, Wageningen, v. 51, p. 149-159, 1997.

LORENZI, H. ; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MARTINS, E.R. ; CASTRO, D.M. ; CASTELLANI, D.C. ; DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 2000. 220 p.

MATERN, V. ; GRIMMIG, B. Natural phenols as stress metabolites. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 381, p. 448-462, 1994.

MEDRANO, H. ; ESCALONA, J.M. ; BOTA, J. ; GULÍAS, J. ; FLEXAS, J. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 895-905, 2002.

MONTANARI JUNIOR, I. Aspectos do cultivo comercial de calêndula. In: [WORKSHOP SOBRE PLANTAS MEDICINAIS: CULTIVO E BENEFICIAMENTO PÓS-COLHEITA]. 2004, Campinas: CPQBA, UNICAMP, 2004. p.70-72.

MORVANT, J.K. ; DOLE, J.M. ; COLE, J.C. Irrigation frequency and system affect *Poinsettia* growth, water use and runoff. **HortScience**, St. Joseph, v. 33, p. 42-46, 1998.

MUNNU SINGH ; SINGH, M. Effects of plant spacing, fertilizer, modified urea material and irrigation regime on herbage, oil yield and oil quality of rosemary in semi-arid tropical conditions. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 3, p. 411-415, 2004.

NASCIMENTO, C.F. **Aspectos anatômicos, fisiológicos e fitoquímicos de plantas jovens de *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) submetidas a diferentes regimes hídricos.** 2003. 65p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A.; NETO, E.B. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.

OLIVEIRA, M.A.J. ; BOVI, M.L.A. ; MACHADO, E.C. ; GOMES, M.M.A. ; HABERMANN, G. ; RORIGUES, J.D. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 59-63, 2002.

PANIZZA, S. **Plantas que curam (Cheiro de Mato).** 3. ed. São Paulo: IBRASA, 1998. 279 p.

PELAH, D. ; SHOSEYOV, O. ; ALTMAN, A. ; BARTELS, D. Water-stress responses in aspen (*Populus tremula*): Different accumulations of dehydrin, sucrose synthase, GAPDH homologues and soluble sugars. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 151, p. 96-100, 1997.

PRADO, C.H.B.A. **Trocas gasosas em planta jovem de *Copaifera langsdorfii* Desf., durante estresse hídrico induzido artificialmente por ausência de rega.** 1991. 93p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1991.

SANTOS, M.D.D. ; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 1-9, 1998.

SAUTER, A. ; DAVIES, W.J. ; HARTUNG, W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant : the fate of the hormone on its way from root to shoot. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1991-1998, 2001.

SHARP, R.E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant Cell and Environment**, Logan, v. 25, p. 211-222, 2002.

SILVA, E.S.A ; ROCHA NETO, O.G. ; FIGUEIREDO, F.J.C. ; MING, L.C. Respostas biofísicas, alocação de biomassa e produção de óleo essencial de “Pimenta Longa” no município de Igarapé-Açu, PA- Brasil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 569, p. 129-136, 2002.

SINGH-SANGWAN, N. ; FAROOQI, A. H.A. ; SINGH-SANGWAN, R. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, Cambridge, v. 128, p. 173-179, 1994.

STACCIARINI-SERAPHIN, E. Ácido Abscísico. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 11, p. 293-307.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2004. 719 p.

TARDIEU, F. ; DAVIES, W.J. Stomatal response to ABA is a function of current plant water status. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 540-545, 1992.

TARDIEU, F. ; LAFARGE, T. ; SIMONNEAU, T. Stomatal control by fed or endogenous xylem ABA in sunflower: interpretation of correlations between leaf water potentials and stomatal conductance in anisohydric species. **Plant Cell Environment**, Logan, v. 19, p. 75-84, 1996.

TURNER, N.C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant and Soil**, The Hague, v. 58, p. 339-366, 1981.

VERLAG, D.A. **Deutsches Arzneibuch**. Stuttgart: Gogi-Verlag GmbH, 1978. 680 p.

YIN, C. ; DUAN, B. ; WANG, X. ; LI, C. Morphological and physiological responses of two contrasting *Poplar* species to drought stress and exogenous abscisic acid application. **Plant Science**, Amsterdam, n. 167, p. 1091-1097, 2004.

WARD, D.A.; BUNCE, J.A. Absciscic acid simultaneously decreases carboxylation efficiency and quantum yield in attached soybean leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 38, n. 192, p. 1182-1192, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monographs on selected medicinal plants. Geneve, 2002. v.2.

ZEEVAART, J.A.D. ; CREELMAN, R.A. Metabolism and physiology of abscisic acid. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 439-73, 1988.

ZHAO- YING ; WANG, XIUQUAN ; CAI, RONCHUN ; ZHAO, Y. ; WANG, X.Q. ; CAI, R.C.
Effect of salient irrigation on yield, ginsenoside and amino acid content of ginseng. **Journal of Jilin Agricultural University**, v. 24, n. 6, p. 50-53, 2002. Abstract.