

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

**Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata*
Link: mecanismos de manutenção do status hídrico**

Rodrigo Fazani Esteves Sanches

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

**Piracicaba
2012**

Rodrigo Fazani Esteves Sanches
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link:
mecanismos de manutenção do status hídrico.**

Orientador:
Prof. Dr. **EMERSON ALVES DA SILVA**

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

**Piracicaba
2012**

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

Sanches, Rodrigo Fazani Esteves

Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link: mecanismos de manutenção do status hídrico / Rodrigo Fazani Esteves Sanches. - Piracicaba, 2012.

78 p: il.

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

1. Ajustamento osmótico 2. Carboidratos 3. Déficit hídrico 4. Fotossíntese
5. Pata-de-vaca I. Título

CDD 633.88
S211r

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

*À querida Carol e meus pais Suzeth e Roberto.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Ao Núcleo de Pesquisa e Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica pela infraestrutura disponibilizada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio Regular Proc. 09/01570-0

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa auxílio.

Ao Dr. Emerson Alves da Silva pela orientação, ensino, colaboração e amizade.

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pelo incentivo, indicação ao PPG em Fisiologia e Bioquímica da ESALQ e por toda colaboração e amizade.

Ao Dr. Ricardo Alfredo Kluge pela orientação acadêmica no início do curso.

À Dra. Márcia Regina Braga e ao Dr. Danilo da Cruz Centeno pela colaboração.

À Maria Solizete Granzio Silva pela competência e por todo auxílio nos assuntos referentes a pós-graduação.

Aos funcionários do NP em Fisiologia e Bioquímica do IBt, Ana Alice, Maria Aparecida e Mary Monteiro.

Aos amigos que sempre proporcionaram agradáveis momentos.

A minha família, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e ajudando de todas as maneiras para a conclusão desse projeto.

Agradeço a Deus pelas conquistas, lições e aprendizados que essa vida oferece.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Goethe

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| LISTA DE SIGLAS | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Espécie modelo | 23 |
| 1.2 Justificativa e Hipótese | 25 |
| 2 OBJETIVOS | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 Material vegetal e condições de cultivo | 29 |
| 3.2 Parâmetros Ecofisiológicos..... | 29 |
| 3.2.1 Umidade do solo..... | 29 |
| 3.2.2 Potencial da água nas folhas (Ψ_{wf})..... | 30 |
| 3.2.3 Taxas de Assimilação líquida do Carbono | 30 |
| 3.2.4 Crescimento Vegetativo | 30 |
| 3.3 Parâmetros Bioquímicos | 31 |
| 3.3.1 Extração de carboidratos solúveis | 31 |
| 3.3.2 Análises quantitativas dos carboidratos solúveis | 31 |
| 3.3.3 Análises qualitativas dos carboidratos solúveis | 31 |
| 3.3.4 Extração e análise quantitativa de amido | 33 |
| 3.3.5 Análise quantitativa de prolina livre | 33 |
| 3.4 Análise estatística..... | 34 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 35 |
| 4.1 Alterações no potencial hídrico, fotossíntese e crescimento..... | 35 |
| 4.2 Influência do déficit hídrico nos teores e perfil de carboidratos e de prolina | 49 |
| 5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 63 |
| REFERÊNCIAS | 65 |

RESUMO

Relações hídricas e respostas ao déficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link: mecanismos de manutenção do status hídrico

O déficit hídrico decorrente da seca se estabelece quando a absorção de água pelas raízes não consegue atender as demandas da planta, entre as quais estão a fotossíntese e transpiração, essenciais ao crescimento vegetal. Para avaliar a influência de déficits hídricos de diferentes intensidades nas relações hídricas, trocas gasosas, crescimento e acúmulo de carboidratos de *Bauhinia forficata* Link, plantas foram cultivadas em casa de vegetação durante três meses em vasos de 20 L e submetidas aos seguintes regimes: regas diária (controle) e regas a cada 7 (7D) e 15 dias (15D) retornando as regas diárias nos regimes 7D e 15D aos 75 dias de experimento. Em intervalos quinzenais (15, 30, 45, 60, 75, 90 dias) foram avaliados a umidade do solo (U_{solo}), potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}), a fotossíntese em resposta a radiação fotossinteticamente ativa (A_{xPAR}) para obtenção da assimilação líquida máxima (A_{max}) e do ponto de saturação luminoso (PAR_{sat}), área foliar total (AFT) e massas secas (MS) de folhas (MS_{f}), caules (MS_{c}) e raízes (MS_{r}). Foi também coletado material vegetal para as análises bioquímicas quantitativas dos teores de açúcares solúveis totais (AST), redutores (AR), amido (S) e prolina (Pro) por métodos colorimétricos e qualitativos da composição de carboidratos solúveis neutros por HPAEC/PAD e análise de açúcares alcoóis por GC/MS. O déficit hídrico afetou as relações hídricas, fotossíntese e crescimento das plantas, sendo que os menores valores de U_{solo} observados nos tratamentos 7D e 15D respectivamente, coincidiram com os menores Ψ_{wf} , A_{max} e acúmulo de MS. Alterações nos PAR_{sat} em resposta ao déficit hídrico foram observadas apresentando valores médios de 665, 275 e 254 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no Controle, 7D e 15D respectivamente. O retorno das regas diárias após 75 dias de experimento, promoveu a recuperação de A_{max} (7,8 e 9,6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e dos PAR_{sat} (588 e 643 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) das plantas 7D e 15D respectivamente aos 90 dias, com valores maiores daqueles observados nas plantas controle (4,7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 631 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), sugerindo forte depend\u00eancia da fotoss\u00edntese de *B. forficata* \u00e0 disponibilidade h\u00eddrica no solo. Os baixos teores de amido em folhas nos tratamentos 7D e 15D podem explicar a manuten\u00e7\u00e3o dos teores de AST semelhante ao controle, bem como, o aumento dos ASTs ap\u00f3s o retorno das regas di\u00e1rias, os quais poderiam ser prontamente utilizados na osmorregula\u00e7\u00e3o e concomitante retomada do crescimento das plantas. A alta detec\u00e7\u00e3o de mio-inositol nas an\u00e1lises de HPAEC/PAD sugerem que os a\u00e7\u00facares alco\u00f3is podem constituir grande parte dos ASTs n\u00e3o redutores em folhas e ra\u00edzes de *B. forficata*. Nas ra\u00edzes, os aumentos na concentra\u00e7\u00e3o de glicerol, galactinol e galactosilglicerol detectados por GC/MS seguem o gradiente de disponibilidade h\u00eddrica dos tratamentos, indicando uma fun\u00e7\u00e3o osmorreguladora destes a\u00e7\u00facares em *B. forficata*.

Palavras-chave: Ajustamento Osm\u00f3tico; Carboidratos; Fotoss\u00edntese

ABSTRACT

Water relations and responses to water deficit in *Bauhinia forficata* Link species: mechanisms of maintenance of water status.

The water deficit caused by drought occurs when root water uptake cannot attend plant demands to maintain photosynthesis and transpiration, two essential processes for plant growth. Aiming to evaluate the influence of water deficits of different intensities on water relations, gas exchange, growth, and carbohydrate accumulation, potted plants of *Bauhinia forficata* Link were grown under greenhouse conditions during three months and submitted to the following water regimes: daily irrigated (control) and irrigated every 7 (7D) or 15 days (15D), recovering the daily irrigations after 75 days of the beginning of the experiment. At fortnightly intervals (15, 30, 45, 60, 75, 90 days) we evaluated soil moisture (U_{solo}), leaf water potential (Ψ_{wf}), photosynthesis in response to photosynthetically active radiation (A_{xPAR}) to obtain the maximum net assimilation (A_{max}) and light saturation point (PAR_{sat}), total leaf area (AFT) and dry mass (MS) of leaves (MS_{f}), stems (MS_{c}) and roots (MS_{r}). Leaves and roots were also sampled for analyses of total soluble sugars (AST), reducing sugars (AR), starch (S), and free proline (Pro) by colorimetric methods. The analyses of the soluble sugar composition were carried out by HPAEC/PAD and GC/MS. The imposed water stress affected the water relations, photosynthesis, and plant growth. Decreases in U_{solo} values observed in the treatments 7D and 15D, respectively, coincided with the lowest Ψ_{wf} , A_{max} and accumulation of MS. Changes in PAR_{sat} in response to water deficit showed mean values of 665, 275, and 254 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in control, 7D, and 15D, respectively. The re-watering after 75 days led to the recovery of A_{max} (7.8 and 9.6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and PAR_{sat} (588 and 643 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of plants 7D and 15D, respectively, at 90 days, with higher values than those observed in the control plants (4.7 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 631 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), suggesting a strong dependence of the photosynthesis of *B. forficata* of the soil water availability. The low leaf starch contents in the 7D and 15D treatments could explain the maintenance of the concentration of AST similar to control, as well as the increase in AST contents after re-watering. These sugars could be promptly used for osmoregulation and concomitant re-start of plant growth. The presence of high amounts of *myo*-inositol detected by HPAEC/PAD analysis suggests that sugar alcohols can constitute the major part of non-reducing ASTs in leaves and roots of *B. forficata*. In roots, increases in the contents of glycerol, galactinol, and galactoglycerol detected by GC/MS indicating that these sugars can play a role in the osmoregulation of *B. forficata*.

Keywords: Carbohydrates; Osmotic Adjustment; Photosynthesis

LISTA DE SIGLAS

A – Taxa de Assimilação Líquida de Carbono

ADP – Adenosina Difosfato

AFE – Área Foliar Específica

AFT – Área Foliar Total

A_{max} – Fotossíntese Máxima

AMG – Amiloglucosidade

AR – Açúcar Redutor

AST – Açúcar Solúvel Total

ATP – Adenosina Trifosfato

BSTFA – N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

DAP – Diâmetro na Altura do Peito

E – Transpiração

GC/MS – Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massa

GODPOD – Glicose PAP Liquiform

g_s – Condutância Estomática

h – Altura

HPAEC/PAD – Cromatografia de Troca Aniônica de Alta Resolução com Detector de Pulso Amperométrico

IRGA – Analisado de Gases no Infravermelho

MOPS – Ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico

MS – Massa Seca

MS_c – Massa Seca de Caule

MS_f – Massa Seca de Folha

MS_r – Massa Seca de Raiz

NADP⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Desidrogenase

PAR – Radiação Fotossinteticamente Ativa

PAR_{Sat} – Radiação Fotossinteticamente Ativa na Saturação

ppm – Partes Por Milhão

Pro – Prolina

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

Rubisco – Ribulose-1,5-*bis*fosfato

S – Amido

SMA – Secretaria do Meio Ambiente

UR – Umidade Relativa do Ar

U_{solo} – Umidade do Solo

Ψ_{wf} – Potencial Hídrico da Folha

Ψ_{o} – Potencial osmótico

1 INTRODUÇÃO

A distribuição dos vegetais na superfície terrestre é basicamente controlada por dois fatores abióticos, a temperatura do ar e a disponibilidade de água no solo. Desde que a temperatura do ar permita que as plantas se desenvolvam, a quantidade e a distribuição de chuvas tornam-se o principal fator limitante ao desenvolvimento vegetal. Essa importância ecológica da água é resultado de sua importância fisiológica, pois, o único meio pelo qual um fator ambiental como a água pode afetar o crescimento de uma planta, é influenciando as condições ambientais e os processos fisiológicos (KOSLOWSKI; PALLARDY, 1997). Devido ao aumento de dióxido de carbono na atmosfera, o qual leva a um aumento na temperatura média do ar, acredita-se que haverá uma maior demanda atmosférica por água e, em muitas regiões, um aumento da ocorrência, frequência, intensidade e distribuição de secas. Os modelos de mudanças climáticas mostram uma alta frequência de chuvas separadas por longos períodos de seca (DORE, 2005). Sendo assim, entre os fatores ambientais, a deficiência hídrica destaca-se como fator adverso ao crescimento e à produção vegetal sendo essencial para estudos que abordem o tema.

O estresse hídrico por falta de água é um dos fatores ambientais mais importantes que podem regular o crescimento e desenvolvimento, limitando a produção e levando também a alterações nas características fisiológicas e bioquímicas das plantas (ZOBAYED, AFREEN, KOZAI, 2007; JONES; CORLETT, 1992). Desse modo, a sobrevivência das plantas sob tais condições estressantes depende em grande extensão da habilidade que as mesmas têm de perceber o estímulo, gerar e transmitir o sinal e iniciar várias alterações fisiológicas e bioquímicas (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997; BOHNERT; JANSEN, 1996).

O déficit hídrico decorrente da seca se estabelece quando a absorção de água pelo sistema radicular não consegue atender as demandas da planta (FAN et al., 2006). Entre as principais demandas estão a fotossíntese e a transpiração da parte aérea, dois processos essenciais ao crescimento vegetal. Antes que o déficit hídrico se estabeleça, as raízes têm que “sentir” a seca no solo e transmitir essa informação à parte aérea, o que gera uma resposta integrada da planta permitindo sua sobrevivência até que a disponibilidade de água aumente. Esta comunicação é feita por vários meios além da redução no fluxo ascendente de água (DAVIES; ZHANG, 1991).

Cumprе ressaltar que, de modo geral, as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas levam primeiro à aclimatação e, posteriormente, quando o déficit hídrico torna-se mais severo ocorrem danos funcionais e perdas de parte das plantas (CHAVES et al., 2003). Durante a fase de aclimatação, o déficit hídrico tipicamente resulta em diminuições nas taxas de crescimento devido à inibição da expansão celular, reduções na assimilação do carbono (OSORIO et al., 1998) e na utilização dos carboidratos, por alterar, basicamente, a eficiência com que os fotoassimilados são convertidos para o desenvolvimento de partes novas na planta, ocasionando mudanças na partição dos carboidratos (HSIAO; XU, 2000) e condicionando as plantas a desenvolverem mecanismos de adaptação e tolerância à seca (JORDAN, 1983).

Nas condições climáticas atuais, em plantas sob déficit hídrico, os principais processos fisiológicos afetados são a condutância estomática, a fotossíntese do mesófilo e, por extensão, o seu crescimento. Entretanto, tais efeitos dependem da espécie estudada bem como da intensidade e duração do déficit hídrico imposto (CHAVES; PEREIRA, 1992). Essas respostas, aliadas às previsões para esse século nas mudanças no regime hídrico sugerem que haverá uma modificação na estrutura e composição da vegetação (IPCC, 2007). De fato, a natureza e a extensão dos efeitos do déficit hídrico sobre as plantas dependem da intensidade e da duração do estresse, bem como da capacidade geneticamente determinada da espécie em lidar com o meio ambiente. Já está bem estabelecido que a taxa de assimilação de carbono nas folhas é suprimida sob déficit hídrico moderado ou mesmo quando há queda na umidade do ar ou no potencial hídrico do solo (CHAVES, 1991; GOLLAN et al., 1986). Nesse caso, o controle estomático desempenha importante papel no controle da fotossíntese quando o período de seca é prolongado (CHAVES, 1991).

As repostas das plantas sob déficit hídrico frequentemente não são desencadeadas pelo potencial químico da água *per se*, mas sim por outros elementos que variam em conjunto com o potencial hídrico da folha e da raiz, tais como a turgescência, o aumento nas concentrações de solutos e compostos químicos provenientes das raízes e que, a sobrevivência de plantas sob seca depende, em parte, da manutenção da capacidade fotossintética das folhas permitindo assim uma rápida recuperação da planta após a reidratação (CHAVES, 1991; ZHANG; DAVIES, 1989; HSIAO, 1973).

As plantas apresentam vários tipos de respostas ao déficit hídrico as quais contribuem para a manutenção do seu status hídrico e por extensão dos processos fisiológicos e

bioquímicos vitais. Estas alterações podem ocorrer tanto em curto prazo, com o aumento na razão sacarose/amido pelo carbono recentemente fixado, como em longo prazo, pelo *pool* de solutos orgânicos de baixo peso molecular, também chamado de solutos compatíveis, em um processo conhecido como ajustamento osmótico, onde ambas as alterações fazem parte de uma resposta reguladora da planta para manter a turgescência foliar sob baixa disponibilidade de água (BAJJI, LUTTS, KINET, 2001; CHAVES, 1991; MORGAN, 1984).

De fato, o ajustamento osmótico tem sido considerado uma adaptação ao déficit hídrico por meio do qual o aumento líquido da concentração de solutos no interior das células pode auxiliar na manutenção da turgescência, permitindo às plantas manterem suas atividades metabólicas, crescimento e produtividade (TURNER, 1997). Segundo Kramer e Boyer (1995), a adição de solutos osmoticamente ativos às células é mais eficaz em promover a diminuição do potencial hídrico do que a própria perda de água. Uma redução de 10% no volume do vacúolo celular provoca a diminuição no potencial osmótico em cerca de 11% do valor inicial, enquanto a adição de solutos é responsável por uma redução de até 50% deste valor.

A partir de trabalhos produzidos na última década, tornou-se evidente que as plantas percebem e respondem rapidamente a alterações, mesmo quando pequenas, na disponibilidade hídrica através de uma série de eventos fisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem em sequencia ou em paralelo (CHAVES, FLEXAS, PINHEIRO, 2009). As respostas em vários níveis são moduladas pela intensidade, duração e taxa de progressão da seca imposta (PINHEIRO; CHAVES, 2011).

A literatura demonstra que a assimilação de carbono foliar pode ser limitada pelo fechamento estomático como resposta a uma diminuição do potencial hídrico da planta, ou pela diferença entre o vapor de água entre o ar e a folha (CHAVES, 1991), acarretando posteriormente a diminuição da difusão de CO₂ atmosférico para o sítio de carboxilação da enzima Ribulose 1-5 *bis*fosfato (Rubisco), geralmente considerada a principal causa da queda da fotossíntese sob condições de limitação hídrica leve a moderada (PINHEIRO; CHAVES, 2011; GRASSI; MAGNANI, 2005; CHAVES et al., 2003).

O fechamento estomático é de fato uma das primeiras linhas de defesa contra a desidratação, pois é um processo rápido e flexível em relação a outras alternativas, tais como mudanças no ciclo de vida, crescimento da raiz ou área foliar, nas quais são mais adequadas para uma adaptação a longo prazo. No entanto, quando os estômatos se fecham protegendo a

planta contra a perda de água, simultaneamente, restringe a assimilação do carbono pela planta (CHAVES, 1991).

O ajustamento osmótico é considerado um dos mecanismos mais dinâmico para a manutenção da turgescência celular, permitindo a manutenção da abertura estomática e da fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo.

De forma a se aclimatar e/ou se adaptar a déficits hídricos de diferentes níveis de intensidade, as plantas podem acumular prolina (YAMADA et al., 2005; NAYYAR e WALIA, 2003) e outros aminoácidos livres (KUSAKA, OHTA, FUJIMURA et al., 2005; RAI, 2002), poliálcoois (RAMANJULU; BARTELS, 2002) e carboidratos (CHAVES et al., 2002; PELLESCI, ROCHER, PRIOUL, 1997). Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem estáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE; CHAMBERLIN, 1994). Além disso, em altas concentrações, exercem pouco ou nenhum efeito sobre a interação de macromoléculas solventes.

Entre esses solutos, os carboidratos são elementos-chave, pois podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (WHITTAKER et al., 2007; BUCKERIDGE et al., 2000).

Neste sentido é plausível que espécies vegetais possam, durante o seu crescimento, ter a síntese e o acúmulo de seus carboidratos afetados pelo déficit hídrico, bem como, utilizá-los na geração de compostos osmoticamente ativos através da sua degradação em resposta a esses estresses do ambiente.

Além dos carboidratos, por muitos anos, a capacidade de acúmulo de prolina tem sido correlacionada com a tolerância ao estresse (SOMAL; YAPA, 1998; MARUR, SODEK, MAGALHES, 1994; SINGH-SANGWAN, FAROOQI; SINGH-SANGWAN, 1994; STEWART; LEE, 1974; SINGH, ASPINAL, PALEG, 1972). Nas plantas, a prolina é sintetizada a partir do glutamato e da arginina sob condições fisiológicas normais, sendo o glutamato o caminho preferencial sob condições de estresse hídrico (CHEN e KAO, 1993). Os níveis intracelulares de prolina são determinados pela biossíntese e pelo catabolismo dessa molécula, e também pelo transporte entre as células e entre os diferentes compartimentos celulares. A compartimentalização do metabolismo de prolina implica que o extensivo transporte intracelular de prolina deve ocorrer entre o citosol, cloroplastos e mitocôndrias. A

biossíntese de prolina é ativada e seu catabolismo reprimido durante a desidratação, considerando que a reidratação desencadeia a regulação oposta (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; XUE, LIU, HUA, 2009).

Algumas espécies caracterizam-se por apresentarem baixos níveis de prolina sob condições ótimas e seu acúmulo durante o déficit hídrico (RAMANJULU; BARTELS 2002). De acordo com Alia (2003), a prolina constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em plantas mantidas sob condições normais, enquanto em plantas submetidas ao estresse hídrico, a concentração de prolina pode chegar a 80% do *pool* total de aminoácidos.

Por um longo tempo, a prolina foi considerada como um osmólito inerte compatível que protege as estruturas subcelulares e macromoléculas sob estresse osmótico. No entanto, seu acúmulo pode influenciar na tolerância ao estresse de várias maneiras. Devido sua alta solubilidade em água, esse aminoácido contribui para o ajuste osmótico da célula enquanto promove o aumento nos níveis de outros osmólitos. A prolina pode funcionar como uma chaperona molecular capaz de proteger a integridade de proteínas e aumentar as atividades de diferentes enzimas (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006; KAVI KISHOR et al., 2005).

Vários estudos têm atribuído uma característica antioxidante à prolina, sugerindo a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e agindo como supressor de oxigênio singlete. Por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, a prolina forma um complexo de transferência de carga e sequestra O₂ livre. Assim, a prolina pode reduzir os danos por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo sequestro e redução da produção de ROS. Os efeitos danosos do oxigênio singlete e radicais hidroxila no fotossistema II (PSII) podem ser reduzidos pela prolina na qual atua como isolante nas membranas dos tilacóides (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; REDDY, CHAITANYA, VIVEKANANDAN, 2004; ALIA, SARADHI, MOHANTY, 1997; MANDAN et al., 1995; SMIRNOFF; CUMBES, 1989). Além disso, a prolina pode agir como uma molécula de sinalização para modular as funções mitocondriais, proliferação e/ou morte celular e influenciar como gatilho na expressão de genes específicos que podem ser essenciais para a recuperação da planta a partir do estresse (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Durante as condições de estresse, a taxa do ciclo de Calvin é diminuída, o que impede a oxidação do NADPH e a restauração de NADP⁺. Quando combinado com luz alta, o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons é suprimido pelo insuficiente *pool* do

aceptor de elétrons NADP⁺, levando a produção de oxigênio singleto no centro de reação do fotossistema I (PSI) e o acúmulo de ROS (CHAVES et al., 2009). A biossíntese de prolina é uma via redutiva e requer NADPH para a redução de glutamato em prolina, o que gera NADP⁺ que pode ser usado posteriormente como aceptor de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. A fosforilação de glutamato consome ATP e produz ADP, que é um substrato para a biossíntese de ATP durante a fotossíntese. Uma taxa aumentada na biossíntese de prolina nos cloroplastos durante o estresse pode manter a razão NADPH:NADP⁺ baixa, e contribuir para sustentar o fluxo de elétrons entre os centros de reações fotossintéticas, estabilizando o equilíbrio redox, reduzindo a fotoinibição e os danos no aparato fotossintético (HARE; CRESS, 1997).

Na mitocôndria, a prolina tem distintas funções de proteção. Após o estresse, o *pool* de prolina fornece um potencial redutor para a mitocôndria, onde, através da oxidação da prolina, é fornecido elétrons para a cadeia transpiratória e, portanto, contribuindo para o fornecimento de energia para o crescimento que foi retomado (KAVI KISHOR et al., 2005; HARE; CRESS, 1997).

Em suma, além da função osmorreguladora em respostas moduladas por estresses abióticos e bióticos, a prolina parece funcionar como um sinal metabólico que regula *pools* de metabólitos e equilíbrio redox, além de controlar a expressão de numerosos genes e influenciar no crescimento e desenvolvimento da planta (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Existem vários trabalhos sobre os efeitos do déficit hídrico na fisiologia de órgãos aéreos e subterrâneos em plantas. No entanto, a maioria desses trabalhos usam como modelo mono ou dicotiledôneas de interesse agrônômico e de crescimento rápido (anuais) tais como, milho (SHARP et al., 2004; FAN; NEUMANN, 2004; SHARP; LENOBLE, 2002), trigo (PIRO et al., 2003; MORILLON; LASSALLES, 2002; ASSENG et al., 1998), grão-de-bico (BASU et al., 2007), mandioca (SANTISOPASRI et al., 2001) e batata (GEIGENBERGER et al., 1997).

Especificamente no caso da batata (*Solanum tuberosum* L.), espécie que acumula amido como principal carboidrato de reserva em seus órgãos subterrâneos (tubérculos) e também uma das mais estudadas sob condições de estresse hídrico, os trabalhos realizados demonstram que a disponibilidade hídrica regula as taxas de síntese de amido e crescimento dos tubérculos (OPARKA; WRIGHT 1988a, b) e que tanto a síntese como a degradação do amido é alterada sob condições de déficit hídrico, com respostas, em geral, associadas ao

aumento nos níveis de açúcares solúveis e inibição da síntese de amido (GEIGENBERGER et al., 1997). De acordo com esses autores, a direção da via metabólica e a conversão de sacarose-amido representam uma importante estratégia através da qual pode ocorrer nos tubérculos a regulação do potencial osmótico, das relações hídricas e por extensão do seu crescimento e da planta como um todo.

O Núcleo de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica-SMA/SP tem tradição no estudo de carboidratos em espécies nativas da Mata Atlântica e do Cerrado e sua importância para o estabelecimento destas espécies em seu ambiente natural (PORTES e CARVALHO 2006; ASEGA; CARVALHO 2004; CHU; FIGUEIREDO-RIBEIRO 2002; CARVALHO, ZAIDAN; DIETRICH, 1997; VIEIRA; FIGUEIREDO-RIBEIRO 1993; GRAZIANO, DIETRICH, FIGUEIREDO-RIBEIRO et al. 1992; FIGUEIREDO-RIBEIRO et al., 1986). No entanto, a despeito dessas informações, pesquisas sobre as relações hídricas e das respostas ao déficit hídrico de espécies nativas tropicais herbáceas e lenhosas de crescimento lento (perenes) que sintetizam diferentes tipos de carboidratos, ainda são escassas.

1.1 Espécie modelo

A espécie *Bauhinia forficata* Link (Pata-de-vaca) (figura 1) é uma árvore decidual, entre 5 a 9 metros de altura e com 20 a 40 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). Seu tronco é geralmente tortuoso de casca cinzenta a castanho amarronzado, onde os ramos jovens apresentam dois acúleos como estípulas na base do pecíolo (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2002; FORTUNATO, 1986). As folhas são bilobadas, alternadas, simples, coriáceas e podem se apresentar glabras ou levemente pubescentes na face dorsal, divididas até a cima do meio, com 8 a 12 cm de comprimento. Os ápices dos lobos são obtusos, arredondados ou agudos e a margem foliar é lisa (LUSA; BONA, 2009; CARVALHO, 2003; LORENZI, 2002; FORTUNATO, 1986). As flores são solitárias, hermafroditas, pentâmeras, de pétalas brancas, podendo chegar a até 10 cm de comprimento, com florescimento de outubro a maio, apresentando sistema de reprodução predominantemente cruzado, com antese noturna, sendo polinizada por morcegos. O fruto é um legume (vagem), apresenta-se aplainado com até 25 cm de comprimento e 2,5 de largura, de coloração marrom escuro quando da maturação, composto por valvas lignificadas, abrindo-se em duas partes, com cinco a dez sementes (LUSA; BONA, 2009; CARVALHO, 2003; FORTUNATO, 1986). A frutificação se dá nos

meses de abril a dezembro. As sementes apresentam formato ovalado, achatado, coloração castanho a preto e medem cerca de 1 cm de comprimento.

A espécie apresenta ampla distribuição neotropical sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Brasil (FORTUNATO, 1986). No Brasil, ocorre em Alagoas, Ceará, Piauí, Pernambuco, Bahia, Mata Grosso do Sul, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Ocorre preferencialmente em planícies aluviais úmidas ou início de encostas, sendo bastante frequente em formações secundárias como capoeiras e capoeirões e em áreas antropizadas como beira de estradas e barrancos, ocorrendo em solos pedregosos ou não. É rara sua ocorrência no interior da mata primária densa (LUSA; BONA, 2009; LORENZI, 2002; FORTUNATO, 1986).

Tem-se estudado com frequência a presença de diversos metabólitos naturais de interesse medicinal, considerando seus aspectos farmacológicos com atividade antioxidante, antiedematogênica, anticolinesterásica e antidiabetes (ENGEL et al., 2008; SILVA et al., 2007; HAEYOUNG et al., 2006; SOUSA, et al., 2004; DUARTE-ALMEIDA, NEGRI, SALATINO, 2004; FARIA et al., 2004).



Figura 1 - *Bauhinia forficata* Link (LORENZI, 2002)

1.2 Justificativa e Hipótese

A seca é um dos principais fatores limitantes à produtividade, tanto em sistemas agrícolas quanto em ecossistemas naturais. Na natureza, a intensidade e a distribuição das chuvas definem o regime hídrico, influenciando desde o crescimento e produtividade dos indivíduos, até a distribuição das populações e a biodiversidade dos ecossistemas. Neste cenário, as alterações climáticas previstas para os próximos anos devido ao aquecimento global, tornam críticos os estudos sobre o uso da água pelas espécies nativas, não apenas para conservar os biomas, mas também para definir estratégias de recuperação de áreas já degradadas, uma vez que o estabelecimento das espécies é uma etapa crítica na recuperação dessas áreas.

Uma abordagem combinada de parâmetros ecofisiológicos e bioquímicos pode fornecer informações novas e valiosas visando o entendimento dos processos de regulação do acúmulo e utilização de carboidratos durante o crescimento de plantas nativas sob condições de déficit hídrico. Por isso, entender as alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo déficit hídrico é primordial para avaliar as respostas das plantas ao estresse e como essas alterações influenciam em seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, tais informações também serão relevantes na criação de modelos de distribuição das espécies em resposta a alterações climáticas e na recuperação de áreas degradadas.

Devido à ampla distribuição da espécie *Bauhinia forficata* Link, sugere-se que esta disponha de mecanismos fisiológicos e bioquímicos, baseados no acúmulo e utilização de carboidratos como osmorreguladores e sinalizadores de estresse, permitindo sua ocorrência e sobrevivência sob diferentes condições ambientais, principalmente sob condições de déficit hídrico. Ademais, pouco se sabe sobre os efeitos de estresses abióticos nessa espécie, considerando que a mesma é amplamente recomendada para projetos de recuperação de áreas degradadas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as relações hídricas em resposta ao déficit hídrico durante o crescimento inicial da espécie *Bauhinia forficata* Link.

- ✓ Avaliar as relações hídricas, alterações no status hídrico e na fotossíntese durante o crescimento das plantas em resposta a diferentes níveis de disponibilidade de água no solo;
- ✓ Quantificar a biomassa e o crescimento das plantas em resposta ao déficit hídrico;
- ✓ Determinar alterações quantitativas e qualitativas dos carboidratos em folhas e raízes das plantas em resposta ao déficit hídrico;
- ✓ Determinar alterações quantitativas de prolina livre em folhas e raízes das plantas em resposta ao déficit hídrico;
- ✓ Caracterizar uma possível função dos carboidratos solúveis no ajustamento osmótico e como sinalizadores em resposta a diferentes níveis de disponibilidade de água.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização do experimento, foram utilizadas plantas de *Bauhinia forficata* Link com 6 meses de idade obtidas no viveiro BioFlora Restauração Florestal localizado no município de Piracicaba - SP e transplantadas para vasos individuais de 20 L, contendo substrato de terra orgânica (Topstrato, HT[®]), as quais foram irrigadas diariamente e receberam solução nutritiva de Clark (CLARK, 1975) uma vez por semana. Os conjuntos vaso-planta foram mantidos na casa de vegetação do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt/SMA/SP) durante todo o período experimental. Após 90 dias de cultivo nesta condição, os diferentes regimes hídricos foram impostos às plantas nos seguintes tratamentos: plantas irrigadas diariamente (controle), irrigadas a cada 7 dias (7D) e irrigadas a cada 15 dias (15D). As avaliações ecofisiológicas e bioquímicas foram realizadas em intervalos quinzenais, sendo o experimento disposto em delineamento inteiramente casualizados com 5 repetições por tratamento por coleta. Foram realizadas 6 coletas ao longo de 3 meses, totalizando 30 plantas por tratamento. O experimento foi realizado entre os meses de setembro e novembro de 2010.

Durante a realização do experimento, a temperatura (°C), a umidade relativa do ar (UR, %) e a radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram monitoradas no interior da casa de vegetação utilizando-se um sensor de temperatura/umidade do ar (Li-1400-140, Li-Cor – Nebraska, USA) e um sensor quantum (Li-190SA, Li-Cor – Nebraska, USA) respectivamente. Os sensores foram conectados a um datalogger (Li-1400, Li-Cor – Nebraska, USA), sendo o equipamento configurado para realização das medidas em intervalos de 10 minutos integrando m\u00e9dias di\u00e1rias dos par\u00e2metros acima.

3.2 Par\u00e2metros Ecofisiol\u00f3gicos

3.2.1 Umidade do solo

A umidade do solo (U_{solo} , %) foi medida pelo m\u00e9todo de Reflectometria no dom\u00ednio do tempo, utilizando-se um sensor modelo ML2-X Delta-T Devices (ThetaProbe, Cambridge, UK).

3.2.2 Potencial da água nas folhas (Ψ_{wf})

De forma a quantificar a intensidade do déficit hídrico imposto às plantas nos diferentes tratamentos, foram realizadas medidas do potencial da água (Ψ_{wf} , MPa) na 2ª folha totalmente expandida a partir do ápice de cada planta no período da antemãhã entre 5:00 e 6:00 horas. Para tal foi utilizado uma bomba de pressão tipo Scholander, modelo 1000 (PMS Instrument Co., UTAH, USA).

3.2.3 Taxas de Assimilação líquida do Carbono

Foram realizadas medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e transpiração (E , $\text{nmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em resposta à radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), curvas AxPAR, onde se definiu a radiação fotossinteticamente ativa na saturação (PAR_{Sat} , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a fotoss\u00edntese m\u00e1xima (A_{max} , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) segundo modelo proposto por Long e H\u00e4llgren (1993). Para tal, foi utilizado um analisador de gases no infravermelho (IRGA) modelo Li-6400 (Li-Cor – Nebraska, USA) em sistema aberto, no per\u00edodo entre 8:00 – 11:00 horas.

As curvas AxPAR foram realizadas na 3ª folha totalmente expandida a partir do \u00e1pice de cada planta, com concentra\u00e7\u00e3o de 380 ppm de CO_2 e intensidade luminosa de 0, 50, 100, 300, 500, 700, 1000 e 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, de modo a verificar poss\u00edveis altera\u00e7\u00f5es nos par\u00e2metros de trocas gasosas analisados em fun\u00e7\u00e3o do d\u00e9ficit h\u00eddrico imposto. Cada ponto desta curva representa uma m\u00e9dia de 5 repeti\u00e7\u00f5es para cada intensidade luminosa.

3.2.4 Crescimento Vegetativo

Em intervalos quinzenais, em cinco plantas de cada tratamento foram avaliadas a altura (h , cm), \u00e1rea foliar total (AFT, cm^2) e massa de mat\u00e9ria seca (MS, g) de folhas (MS_f), caules (MS_c) e ra\u00edzes (MS_r). A \u00e1rea foliar total foi determinada utilizando um medidor de \u00e1rea foliar (Li-3000, Li-Cor, Nebraska, USA). A massa de mat\u00e9ria seca foi obtida ap\u00f3s secagem em estufa \u00e0 70°C por 72 horas e pesadas em balan\u00e7a anal\u00edtica (BL 3200H, Shimadzu Corporation, JP).

Os dados de AFT e MS foliar foram utilizados para c\u00e1lculo da \u00e1rea foliar espec\u00edfica (AFE, $\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}$) pela seguinte equa\u00e7\u00e3o (1):

$$\text{AFE} = \text{ \u00c1rea foliar} / \text{Massa seca} (\text{cm}^2 \text{ g}^{-1}) \quad (1)$$

3.3 Parâmetros Bioquímicos

Para a análise dos parâmetros bioquímicos, no mínimo 2g de massa fresca, de folhas e raízes foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para extração e avaliação dos parâmetros bioquímicos.

3.3.1 Extração de carboidratos solúveis

Após as coletas, as amostras de folhas e raízes criopreservadas foram liofilizadas (ModulyoD freezer Dyer 5 L, Thermo Electron, USA) e posteriormente pulverizadas em moinho de bola. Essas amostras pulverizadas foram submetidas à extração de carboidratos solúveis segundo Carvalho, Pinto e Figueiredo-Ribeiro (1998). Aproximadamente 400 mg de cada material (folha e raiz) foi submetido, à extração em 10 ml de etanol 80% e mantidas em banho-maria à 80°C por 15 minutos, sendo então centrifugadas (Sorvall Super T21, Kendro Laboratory Products, USA) a 700 g por 15 minutos. Os resíduos foram re-extraídos mais duas vezes e os sobrenadantes das três extrações etanólicas reunidos foram concentrados em rotavapor (r-215, Buchi, Switzerland) a 40°C e ressuspendido em 15 ml de água destilada e mantidas a -20°C. Os resíduos precipitados após a extração foram liofilizados e utilizados para extração e dosagem de amido.

3.3.2 Análises quantitativas dos carboidratos solúveis

A análise quantitativa dos açúcares solúveis totais (AST) dos extratos de folha e raiz foi realizada através do método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se glucose (Sigma[®]) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SP-22, Biospectro, Curitiba, BR) regulado para comprimento de onda de 490 nm.

Os conteúdos de açúcares redutores (AR) dos extratos de folha e raiz foram analisados colorimetricamente de acordo com o método Somogyi (1945), utilizando-se glucose (Sigma[®]) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm. Os teores estimados de açúcares (AST e AR) foram obtidos através de cálculos baseados em equações da reta geradas a partir de curvas padrões.

3.3.3 Análises qualitativas dos carboidratos solúveis

A composição dos açúcares solúveis totais (AST) nas folhas e raízes foi avaliada nos extratos etanólicos obtidos e reunidos após extração de carboidratos solúveis.

As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) e por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS), nas amostras dos tempos 15, 30, 75 e 90 dias de coleta.

- **HPAEC/PAD**

Alíquotas de 1 ml de cada amostra composta foram submetidas à purificação em colunas de trocas iônicas, utilizando as resinas catiônica Dowex 50x8 (100-200 mesh) e aniônica Dowex 1x8 (52-100 mesh). A eluição dos açúcares foi feita com água deionizada e as amostras recolhidas das colunas de troca iônica tiveram seu pH ajustado para 7,0 com hidróxido de amônio (0,4M). Após o ajuste do pH de cada amostra, estas foram liofilizadas e ressuspensas em 1,0 ml de água deionizada. Em seguida, uma nova dosagem dos AST pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi realizada para ajustar a concentração de cada amostra para 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (CARVALHO, ZAIDAN e DIETRICH, 1997). Foram realizadas análises por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em coluna Carbo-Pac PA1 em sistema Dionex ICS 3000 (Dionex, Thermo Scientific, USA). Os monossacarídeos foram eluídos isocraticamente com 100 mM de hidróxido de sódio, com fluxo de 0,25 ml min^{-1} e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de *mio*-inositol, glicose, frutose e sacarose. O tempo de corrida foi de 30 minutos.

- **GC/MS**

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS), seguindo método de Roessner et al. (2001) adaptado, onde 300 μl de cada amostra purificada e utilizada para análise em HPAEC/PAD foram secas em speed-vac (Hetovac VR-1 Centrifuge w/Rotor, HetoLab Equipment, USA) para, em seguida, serem derivatizadas em 150 μl de piridina, 50 μl de cloridrato de metoxilamina (20 mg ml^{-1} de piridina) e 50 μl de BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). Após a derivatização, as amostras foram submetidas à agitação em vórtex e aquecidas a 75°C em banho seco por 1 hora e transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados, e injetadas em um sistema GC/MS (Agilent GC 6890 e MSD 5973N, Agilent Technologies, USA). A corrida no cromatógrafo foi executada com o auxílio de uma coluna HP5 de 30 m com 0,25 μm de espessura (Supelco, Bellfonte, CA, USA). A temperatura de injeção foi ajustada a 230°C, a interface a 250°C, e a fonte de íons a 150°C. Hélio foi usado como gás carreador a um fluxo

de 1 ml min⁻¹. A análise foi conduzida sob a seguinte programação de temperatura: 5 minutos de aquecimento a 70°C, seguido de uma rampa na temperatura do forno de 5°C min⁻¹ até 310°C e 1 minuto de aquecimento a 310°C. O espectro de massas foi armazenado a uma taxa de 2 varreduras s⁻¹ na faixa de 50 a 650 m/z. Os dados foram gerados e analisados através do programa Chemstation (Agilent Technologies, USA). Os picos detectados foram comparados com padrões autênticos e com a NIST 08 Mass Spectral Library e confirmados através do cálculo do índice de Kovats.

3.3.4 Extração e análise quantitativa de amido

Os resíduos restantes da extração exaustiva dos AST em etanol 80% foram liofilizados e submetidos à quantificação de amido (S) pelo método enzimático de Amaral et al. (2007). Onde em 10 mg de resíduo liofilizado de cada amostra foram adicionados 0,5 ml (120 U ml⁻¹) de α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Megazyme[®]), diluída em tampão MOPS (ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico) 10 mM e pH 6,5. Logo após, as amostras foram incubadas a 75°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50°C em banho-maria e foi adicionado uma segunda solução contendo 0,5 ml (30 U ml⁻¹) de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (Megazyme[®]), em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 4,5, seguido por incubação das amostras a 50°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 30 unidades de enzima.

Após as quatro incubações, foram acrescentados 100 μ l de ácido perclórico 0,8 M para interromper as reações e precipitar proteínas. Em seguida, foi realizada uma incubação por 15 minutos a 30°C GODPOD (Glicose PAP Liquiform / Centerlab[®]), sendo que o teor de glucose determinado em leitor de microplacas de ELISA (KC4, Biotek Instruments, USA) a 490 nm. A curva padrão foi obtida a partir de concentrações crescentes de glucose (Sigma[®]).

3.3.5 Análise quantitativa de prolina livre

A prolina livre (Pro) foi quantificada nas frações etanólicas de folhas e raízes obtidas e reunidas após a extração de carboidratos solúveis conforme Bates, Waldren e Teare (1973) com modificações. Alíquotas de 2 ml das frações etanólicas foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e, em seguida, foi adicionado ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina; 30 ml de ácido acético glacial e 20 ml de ácido fosfórico 6 M) e ácido acético glacial concentrado. Os tubos, hermeticamente fechados, foram agitados em vórtex e levados ao banho-maria a 100°C durante 1 hora. Após essa etapa, a reação foi interrompida por meio de banho de gelo.

Em seguida foi adicionado 4 ml de tolueno à reação e cada tubo de ensaio foi agitado por aproximadamente 15 segundos, formando-se duas fases, onde a fase superior (cromóforo + tolueno) foi recuperada e submetida a leitura em espectrofotômetro a 520 nm.

Uma curva padrão foi construída a partir de concentrações de L-prolina (Synth[®]) e através da equação da reta foi possível estimar o teor de prolina das amostras.

3.4 Análise estatística

Dados dos parâmetros ecofisiológicos (U_{solo} , Ψ_{wf} , A_{max} , PAR_{Sat} , h , AFT, e MS) e dos parâmetros bioquímicos (AST, AR, S, Pro) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo todo e qualquer contraste entre médias avaliados pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote estatístico BioEstat 3.0 (AYRES et al., 2000). Testes de normalidade foram realizados previamente.

Foram realizadas também análises de correlação simples de Pearson entre os parâmetros avaliados. A significância das correlações foi analisada pelo teste “*t*” de Student em nível de 5% de probabilidade. Em adição foi utilizada a estatística descrita.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Alterações no potencial hídrico, fotossíntese e crescimento

As variações na temperatura do ar, radiação fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa do ar (UR, %) no interior da casa de vegeta\u00e7\u00e3o durante o experimento, s\u00e3o apresentadas na figura 2. A temperatura m\u00e9dia do ar durante todo o experimento foi de $25,8^{\circ}\text{C}$ com valores m\u00e9dios m\u00ednimos de 21°C e m\u00e1ximos de 31°C . Sob condi\u00e7\u00f5es naturais e em casa de vegeta\u00e7\u00e3o, com o aumento da radia\u00e7\u00e3o, a temperatura eleva-se e a umidade relativa do ar diminui (MEDINA, MACHADO, GOMES, 1999) aumentando a demanda atmosf\u00e9rica por \u00e1gua. De fato, conforme esperado, observou-se uma correla\u00e7\u00e3o inversa significativa entre a PAR e a UR ($r = 0,705$; $p = 0,0229$), sendo que os menores valores m\u00e9dios de PAR ($345,9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) coincidem com os maiores valores m\u00e9dios de UR (57%), indicando influ\u00eancia da alta nebulosidade caracter\u00edstica dessa \u00e9poca do ano nesses par\u00e2metros meteorol\u00f3gicos.

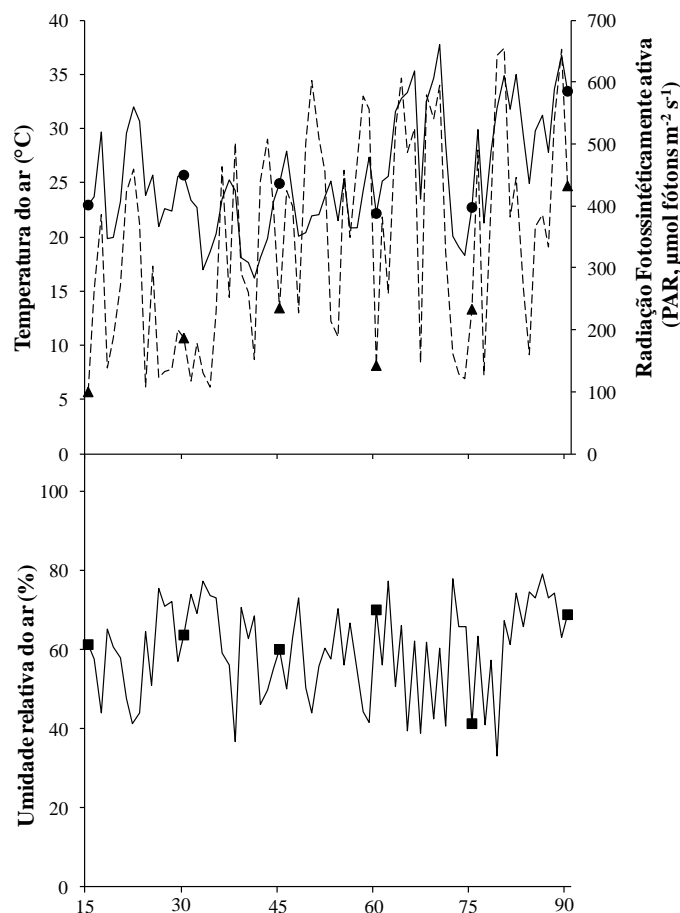


Figura 2 - Temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) (\bullet), radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa (PAR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (\blacktriangle) e umidade relativa do ar (UR, %) (\blacksquare) no interior da casa de vegeta\u00e7\u00e3o do N\u00facleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioqu\u00edmica do Instituto de Bot\u00e2nica de S\u00e3o Paulo durante o per\u00edodo experimental. Os s\u00edmbolos indicam os dias de coleta

A umidade do solo (U_{solo}) manteve praticamente constante nos vasos das plantas controle com valores entre 22 a 26% (figura 3). Entretanto, para os vasos das plantas submetidas à suspensão de rega dos tratamentos 7D e 15D, os valores variaram entre 1 e 10%, e 1 a 8% respectivamente, havendo diferença estatística entre esses tratamentos apenas no 15º dia de experimento, sendo que as menores U_{solo} observadas coincidiram com baixos valores de UR (57%) e valores elevados de PAR ($405 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no 60º dia. Após a coleta do 75º dia, ocorreu o retorno das regas diárias nos vasos de plantas dos tratamentos 7D e 15D até o 90º dia do experimento, onde os valores de U_{solo} chegaram a 18% não apresentando diferenças estatísticas em relação ao controle.

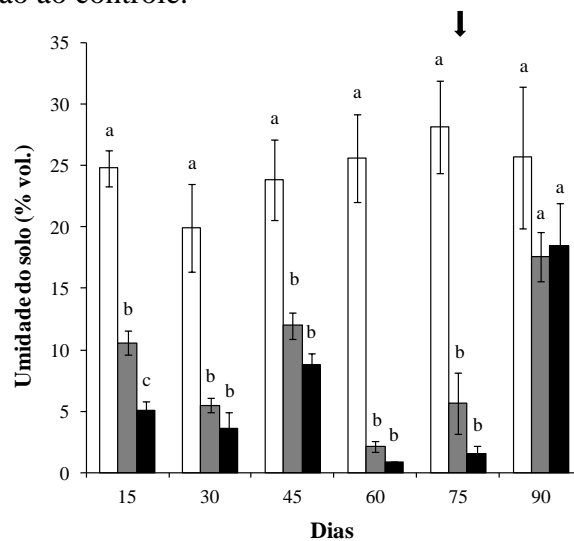


Figura 3 - Umidade do solo (U_{solo} , % vol.) nos vasos de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=5). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Os regimes de irrigação de 7D e 15D foram suficientes para gerar déficits hídricos nas plantas ocasionando reduções significativas no potencial hídrico das folhas (Ψ_{wf} , MPa) (figura 4), nas taxas de assimilação líquida do carbono (A) (figura 5), condutância estomática (g_s) (figura 6) e transpiração (E) (figura 7) em relação às plantas do controle. Devido a frequente reposição de água no solo, as plantas do controle não apresentaram variação significativas no Ψ_{wf} , mantendo-se sempre superior a -1,0 MPa, mostrando que a irrigação diária foi suficiente para manter os altos valores de U_{solo} e baixos valores de Ψ_{wf} durante todo o experimento. Por outro lado, as plantas do tratamento 7D e 15D, apresentaram valores médios de -1,0 e -1,45 MPa no início do experimento e -2,0 e -3,0 MPa após 30 dias respectivamente. Entretanto apenas as plantas do tratamento 15D apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle nesses dias.

As plantas dos tratamentos 7D e 15 D foram reirrigadas 2 dias antes da coleta do 45º dia, onde os valores do Ψ_{wf} chegaram a -1 e -1,12 MPa respectivamente, mostrando uma rápida reidratação foliar. Porém, já aos 60 dias de experimento, os tratamentos 7D e 15D apresentaram valores médios de -3,3 e -4,3 MPa respectivamente, com efeitos visíveis na g_s (figura 6) e na E (figura 7) que apresentaram seus menores valores, mas ainda assim as plantas dos respectivos tratamentos apresentaram taxas fotossintéticas positivas. Como esperado, observou-se uma correlação positiva entre as variações na U_{solo} e no Ψ_{wf} nas plantas dos tratamentos 7D ($r = 0,916$; $p = 0,010$) e 15D ($r = 0,828$; $p = 0,042$), isto é, a medida que a disponibilidade hídrica do solo diminui, o Ψ_{wf} também diminui.

A exemplo do observado para a U_{solo} , o retorno das regas diárias após os 75 dias de experimento, permitiram o aumento Ψ_{wf} das plantas submetidas ao déficit hídrico a valores semelhantes aos das plantas controle.

O déficit hídrico imposto às plantas neste trabalho foi suficiente para gerar alterações no conteúdo e na energia livre da água no solo e nas plantas, que por sua vez afetaram os processos fisiológicos e bioquímicos de *B. forficata*. Com efeito, a diminuição do teor de água é acompanhada pela perda de turgescência e murcha, interrupção na expansão celular, fechamento estomático, redução da fotossíntese e interferência de muitos outros processos metabólicos básicos como na síntese e degradação de carboidratos, proteínas e na acumulação de solutos afetando o crescimento e produtividade do vegetal (KUMAR; SING, 1998; HU; SCHMIDHALTER, 1998; KRAMER; BOYER, 1995).

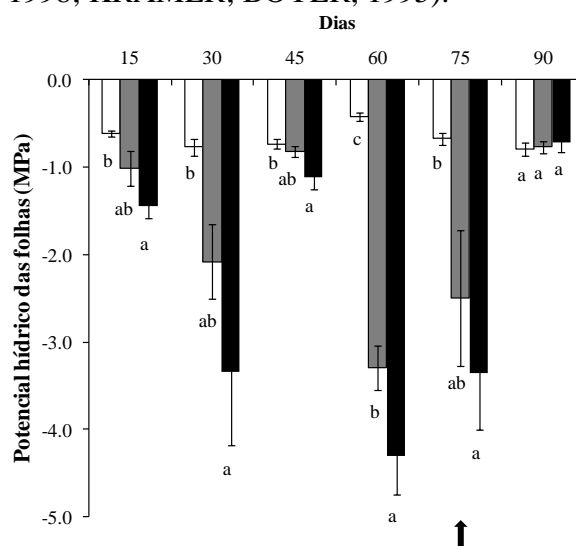


Figura 4 - Potencial hídrico (Ψ_{wf} , MPa) na antemã em folhas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média ($n=5$). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Associadas às medidas de potencial hídrico (figura 4), as taxas de assimilação líquida do carbono (A) (figura 5) em resposta à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e as análises de crescimento (figuras 10, 11 e 13) evidenciam uma relação de dependência das plantas de *B. forficata* à disponibilidade hídrica do solo.

Observa-se na figura 5 que a A nos tratamentos 7D e 15D foram afetadas logo aos 15 dias de experimento com valores sempre inferiores em relação ao controle, inclusive com taxas nulas já no 30º dia de experimento. A reirrigação das plantas dos tratamentos 7D e 15D antes das análises e coleta aos 45 dias permitiu a retomada de taxas fotossintéticas positivas, porém, retornando a valores nulos e negativos nas medidas realizadas aos 60 e 75 dias. Juntamente com a luz, a disponibilidade de água constitui um dos mais importantes fatores que afetam negativamente, a produtividade das plantas, principalmente por reduzir a condutância estomática, fotossíntese e acúmulo de matéria seca (BLUM, 1997).

Em adição, vale destacar que as taxas fotossintéticas máximas (A_{max}) (figura 8A) das plantas sob déficit hídrico apresentaram uma alta e significativa correlação com a U_{solo} ($r = 0,806$; $p = 0,050$ e $r = 0,846$; $p = 0,034$) e Ψ_{wf} ($r = 0,887$; $p = 0,018$ e $r = 0,941$; $p = 0,005$) nos tratamentos 7D e 15D respectivamente. Tais correlações associadas ao fato de que após o retorno das irrigações diárias a partir do 75º dia de experimento, as plantas dos tratamentos 7D e 15D além de retomarem valores positivos de fotossíntese, apresentaram taxas fotossintéticas maiores que as observadas nas plantas controle, reforçando a relação de dependência da fotossíntese de *B. forficata* à disponibilidade hídrica.

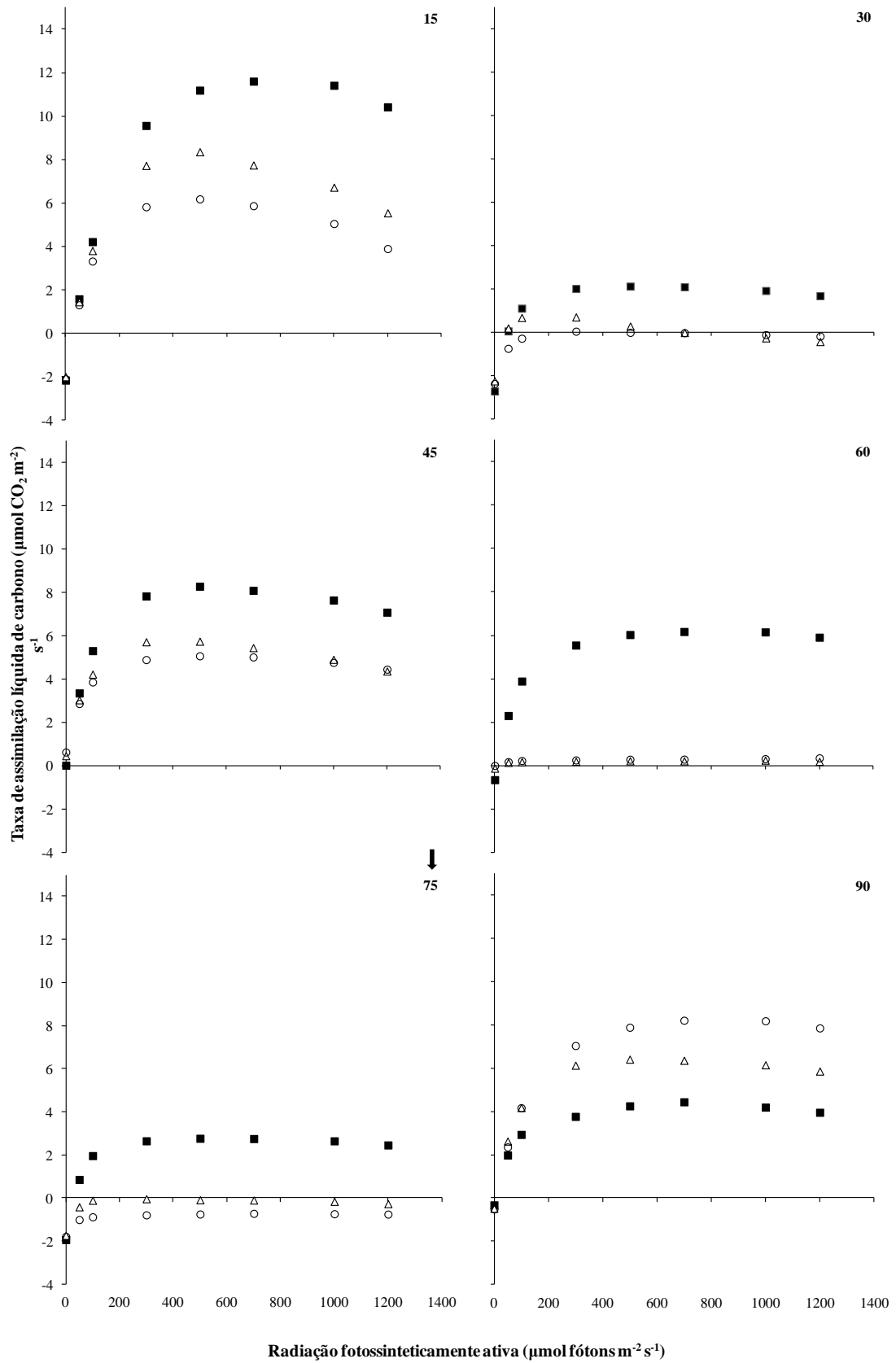


Figura 5 - Curvas de resposta da assimilação líquida de carbono (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) à radiação fotossinteticamente ativa ($A_x\text{PAR}$) de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle - ■) e regas a cada 7 (7D - Δ) e 15 dias (15D - ○). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D ($n=5$)

Ainda com relação às trocas gasosas, observa-se na figura 6 que a influência do déficit hídrico na A das plantas foi em parte exercida por meio de reduções na g_s , impedindo inclusive que as plantas, em ambos os tratamentos 7D e 15D alcançassem seus pontos de compensação fotossintético. Não obstante, a retomada dos valores positivos das taxas de A aos 90 dias nas plantas 7D e 15D com valores maiores que as do controle, analisadas em conjunto com o dados de g_s (figura 6) e E (figura 7) sugerem um aumento na eficiência do uso da água, pois os valores de g_s mantiveram-se baixos quando foi retomada as regas diárias após os 75 dias de experimento e a A aumentou consideravelmente, indicando rápida aclimatação do aparato fotossintético das plantas 7D e 15D à baixa disponibilidade de água no solo e após a recuperação hídrica.

O processo de abertura e fechamento dos estômatos está relacionado principalmente com a intensidade de luz e estado de hidratação da folha. Dessa forma, o funcionamento dos estômatos e a área foliar influenciam na produtividade do vegetal, pois controla a absorção de CO_2 e determina a área de interceptação de luz (COSTA; MARENCO, 2007). Em situações onde há baixa disponibilidade hídrica no solo, as plantas reduzem sua condutância estomática visando diminuir a perda de água por transpiração, assim, favorecem a manutenção da turgescência celular em situações de seca (SILVA et al., 2004). No entanto, quando os estômatos se fecham protegendo a planta contra a perda de água, simultaneamente, restringi a difusão de CO_2 atmosférico para as câmaras subestomáticas (TAIZ; ZEIGER, 2009; CHAVES, 1991). A figura 6 mostra a condutância estomática (g_s) das plantas de *B.forficata* submetidas ao déficit hídrico, onde, as plantas dos tratamentos 7D e 15D mantiveram seus estômatos constantemente fechados quando a disponibilidade hídrico do solo era inferior a 10%.

Medina, Machado e Gomes (1999), estudando condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira "Valência" sob deficiência hídrica, visualizaram que tanto a A como a g_s diminuem e a E aumenta quando o déficit de pressão de vapor e temperatura aumentaram, indicando queda na eficiência do uso da água nessa plantas e que, em geral, sob deficiência hídrica a queda da A é devido ao fechamento estomática sendo que a recuperação da A ocorre em paralelo à recuperação da g_s .

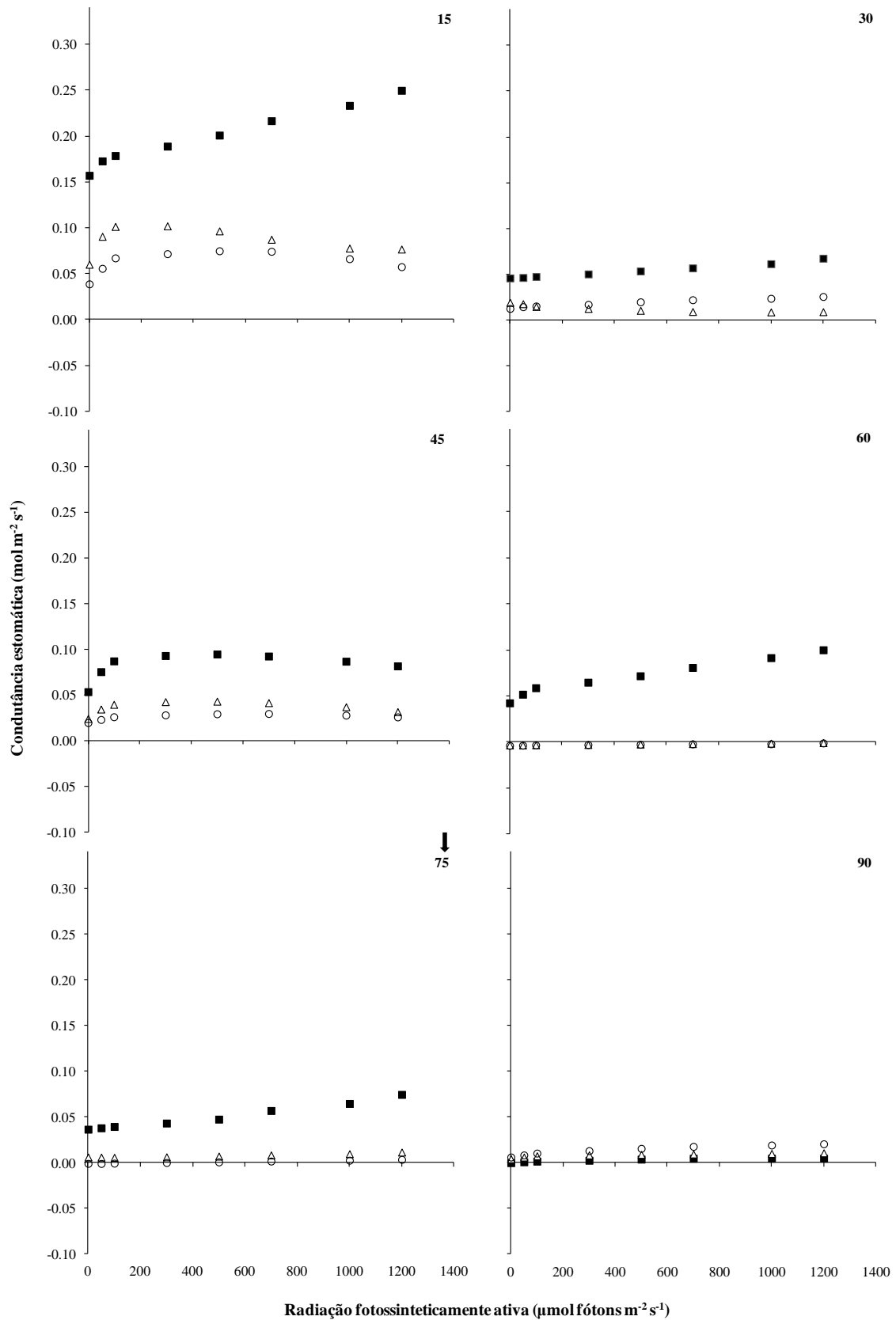


Figura 6 - Curvas de condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em resposta \u00e0 radia\u00e7\u00e3o fotossinteticamente ativa ($g_s \times \text{PAR}$) de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas di\u00e1ria (Controle - ■) e regas a cada 7 (7D - Δ) e 15 dias (15D - ○). A seta indica o dia do retorno das irriga\u00e7\u00f5es di\u00e1rias nos tratamentos 7D e 15D (n=5)

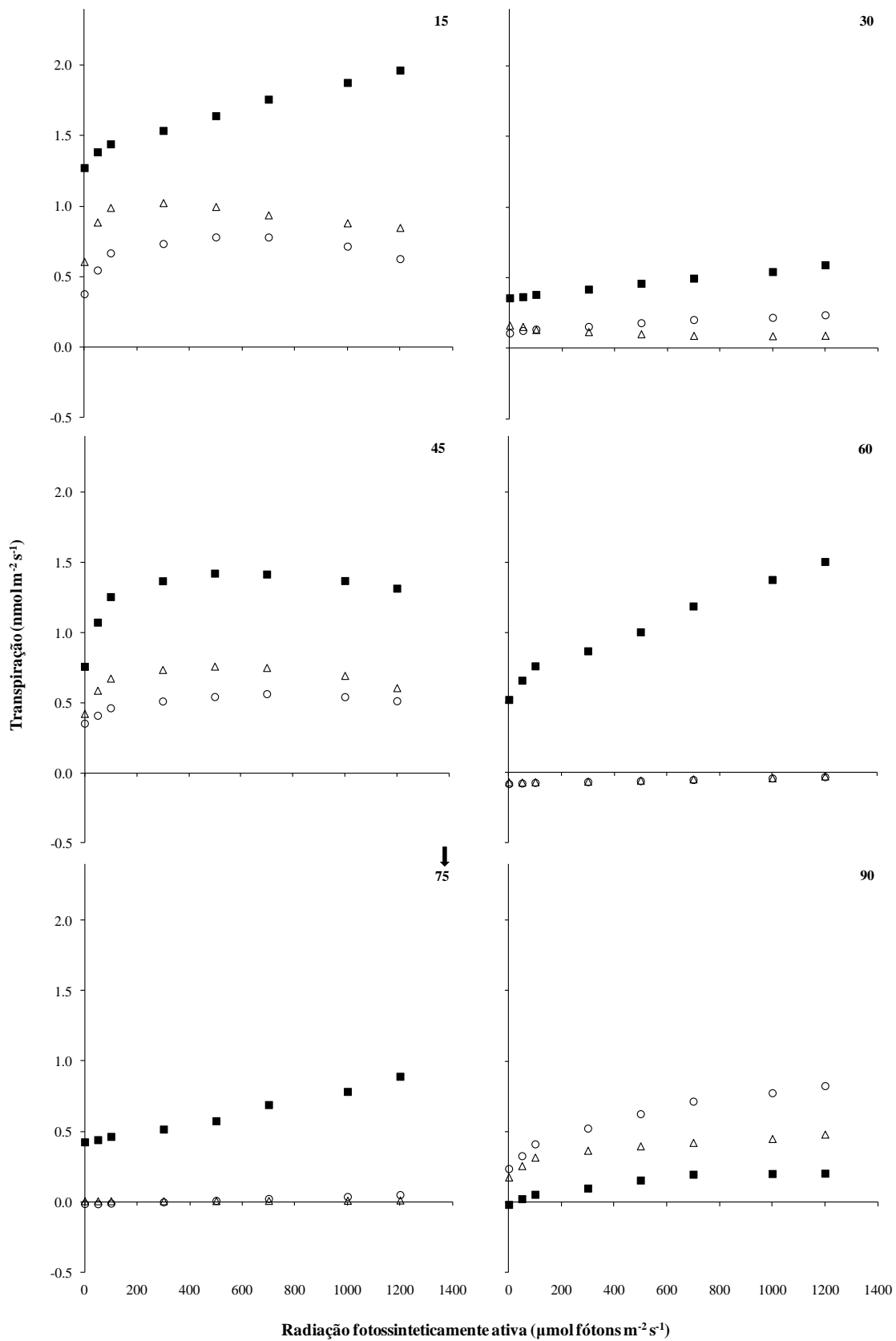


Figura 7 - Curvas de transpiração (E , $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em resposta à radiação fotossinteticamente ativa (E_{xPAR}) de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle - ■) e regas a cada 7 (7D - △) e 15 dias (15D - ○). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D ($n=5$)

Os dados de fotossíntese máxima (A_{max}) (figura 8A) obtidos a partir das curvas AxPAR (figura 5) demonstram que no período em que o experimento foi realizado (Set a Out/2010) as taxas fotossintéticas máximas em *B. forficata* foram de $12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ observada logo no início do experimento nas plantas controle, nas quais apresentaram valores de A_{max} sempre maiores das encontradas nas plantas dos tratamentos 7D e 15D até o 75º dia de experimento. No entanto, com o retorno das regas diárias, ocorreu a recuperação de A_{max} das plantas dos tratamentos 7D e 15D com valores de 7,8 e 9,6 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente no 90º dia, com valores maiores daqueles observados nas plantas controle, $4,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A figura 8B ainda mostra que os radiação fotossinteticamente ativa na saturação (PAR_{sat}) foram alterados em resposta ao déficit hídrico imposto às plantas nos tratamentos 7D e 15D. Sob condições ótimas de disponibilidade hídrica, os PAR_{sat} apresentaram valores médios de $665 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no controle enquanto que nos tratamentos 7D e 15D apresentaram valores mínimos de 43 e 18 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente e obviamente nulos quando as planta somente fotorrespiraram aos 75 dias de experimento conforme se depreende das curvas AxPAR (figura 5). Com efeito, a exemplo do observado em A_{max} os PAR_{sat} das plantas nos tratamentos 7D e 15D correlacionaram-se significativamente com a U_{solo} ($r = 0,775$; $p = 0,050$ e $r = 0,881$; $p = 0,020$) e Ψ_{wf} ($r = 0,868$; $p = 0,025$ e $r = 0,929$; $p = 0,007$) respectivamente.

O comportamento fotossintético das plantas em resposta ao déficit hídrico em nosso experimento, são semelhantes àqueles observados por Portes, Alves e Souza (2006), que também avaliaram sob condição de campo o efeito do déficit hídrico na fotossíntese de *B. forficata* presentes em regiões de clareira e sub-bosque. Esses autores mostraram que valores de Ψ_{wf} da ordem de -2,47 e -3,3 MPa observados respectivamente sob condições de sub-bosque e clareira no fim da estação seca e após 45 dias sem chuva caracterizaram uma situação de déficit hídrico, o qual por seu turno reduziu as taxas fotossintéticas das plantas, indicando que o estresse hídrico afetou significativamente a utilização da radiação fotossinteticamente ativa.

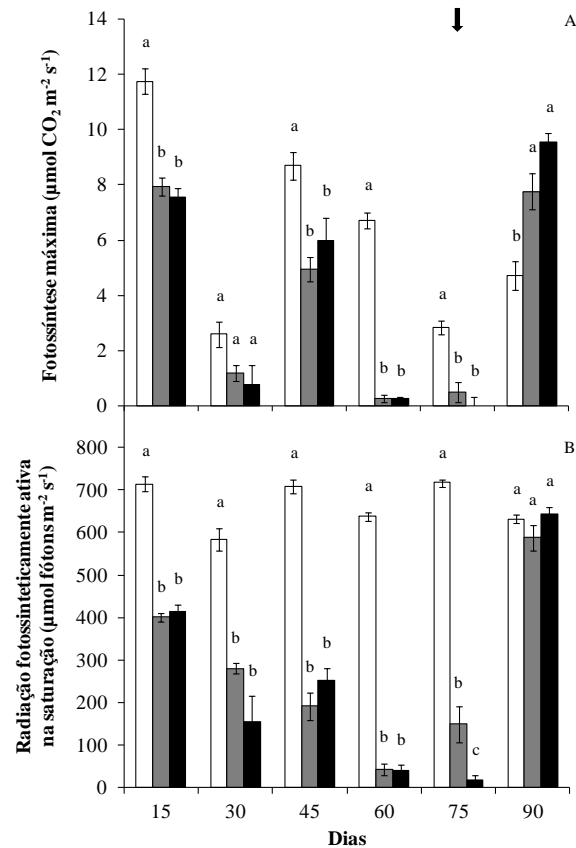


Figura 8 - Fotossíntese máxima (A_{max} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Radiação fotossinteticamente ativa na saturação (PAR_{Sat} , $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas di\u00e1ria (Controle - □) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irriga\u00e7\u00f5es di\u00e1rias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padr\u00e3o da m\u00e9dia (n=5). M\u00e9dias seguidas de mesma letra em cada coleta n\u00e3o diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em n\u00edvel de 5% de probabilidade

O d\u00e9ficit h\u00eddrico imposto \u00e0s plantas em ambos os regimes de rega, 7D e 15D, foram suficientes para reduzir o crescimento das plantas em rela\u00e7\u00e3o ao controle em todas as vari\u00e1veis avaliadas, como a altura (figura 10), a \u00e1rea foliar total (figura 11) e a massa seca de folhas, caules e r\u00e1izes (figura 13), sendo as principais diferen\u00e7as observadas a partir do 45\u00b0 dia de experimento, per\u00edodo em que as plantas dos tratamentos 7D e 15D j\u00e1 haviam passado por 6 e 3 ciclos de reirriga\u00e7\u00e3o respectivamente.

Interessante destacar, que al\u00e9m de diferen\u00e7as significativas observadas entre os tratamentos ao longo do experimento, correla\u00e7\u00f5es significativas entre os par\u00e2metros de crescimento e as altera\u00e7\u00f5es nos teores de carboidratos sol\u00faveis, amido e prolina foram observadas nos tratamentos controle e 7D, por\u00e9m, sem correla\u00e7\u00f5es significativas no tratamento 15D. Os coeficientes, bem como, a signific\u00e2ncia destes ser\u00e3o discutida juntamente com os resultados das an\u00e1lises de carboidratos e prolina livre.

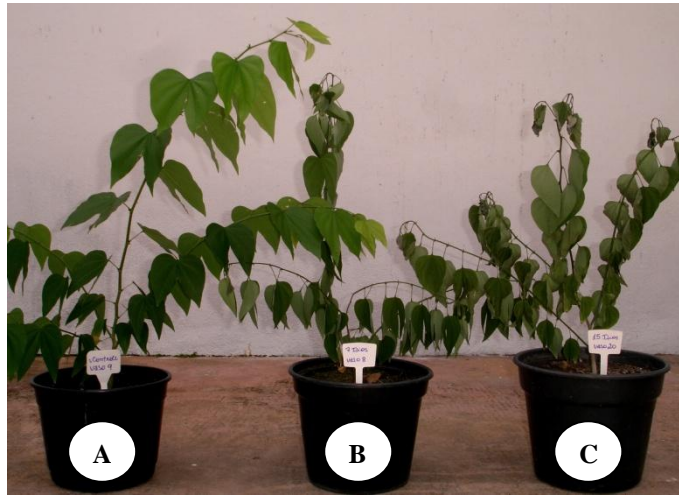


Figura 9 - Aspecto das plantas de *Bauhinia forficata* nos diferentes tratamentos controle (A), 7D (B), 15D (C) aos 45 dias de experimento

A altura (h) das plantas (figura 10) nos tratamentos 7D e 15D foi cerca de 27 e 40% menor quando comparadas ao controle. No entanto, não houve diferença estatística na altura das plantas do tratamento 7D em relação as plantas do controle ao longo de todo experimento. Além disso, é interessante observar que o retorno de regas diárias a partir do 75º dia permitiu a retomada do crescimento em altura das plantas no tratamento 7D. Por outro lado, isso não ocorreu nas plantas do tratamento 15D. Segundo Shao et al. (2008), o crescimento é um dos processos fisiológicos mais sensíveis a seca, devido a redução da pressão de turgor celular, que, por sua vez, afeta a expansão celular limitando o crescimento e desenvolvimento da planta.

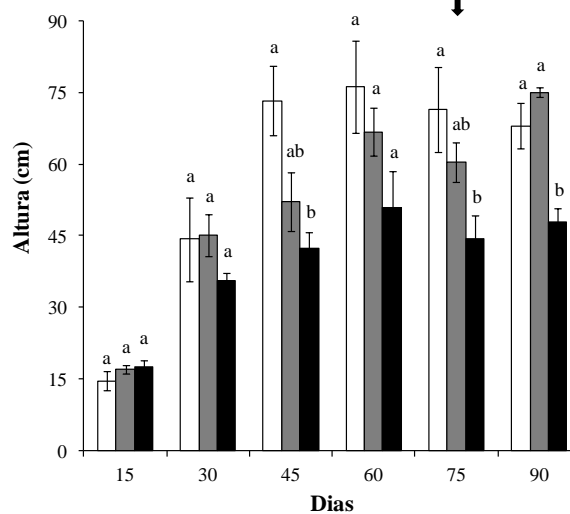


Figura 10 - Altura (h , cm) média das plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de rega diária (Controle - □) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média ($n=5$). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Com relação à área foliar total (AFT) (figura 11A) observa-se que o ganho de área foliar foi afetado já a partir do 30º dia em ambos os tratamentos 7D e 15D alcançando diferenças de 44 e 70% aos 60 dias de experimento respectivamente em relação ao controle. Ressalta-se que no tratamento 7D o ganho de área foliar foi mantido mesmo com taxas mínimas, ao contrário do tratamento 15D em que a AFT manteve-se equivalente desde o início do experimento, retomando seu crescimento somente após o retorno das regas diárias a partir do 75º dia.

Concomitantemente, as plantas do tratamento 7D apresentaram níveis mais altos de açúcares solúveis totais aos 45 e 60 dias de experimento e um progressivo acúmulo de amido nas raízes ao longo do experimento, sugerindo a manutenção do crescimento durante o período de suspensão de rega.

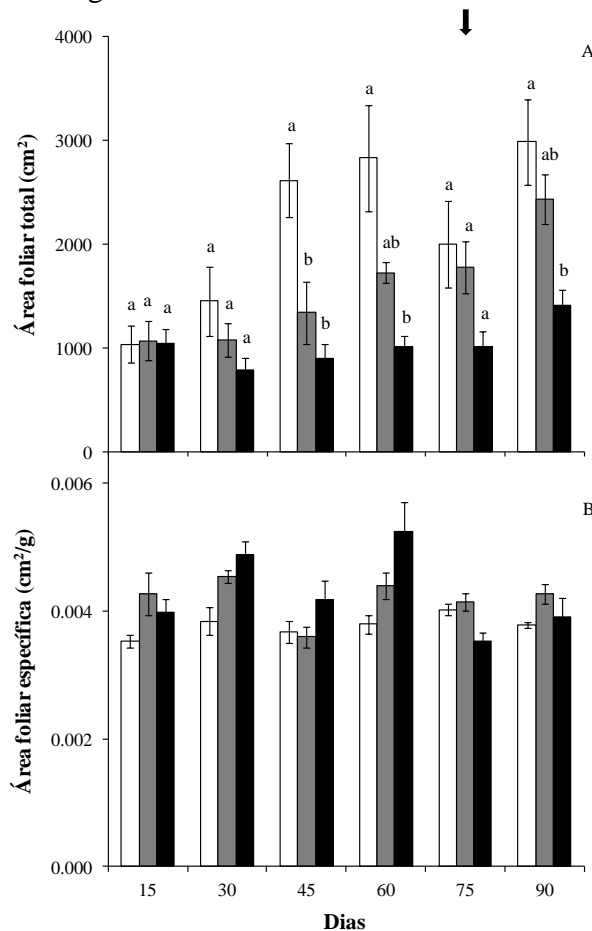


Figura 11 - Área Foliar Total (AFT, cm²) e Área Foliar Específica (AFE, cm²/g) das plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=5). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

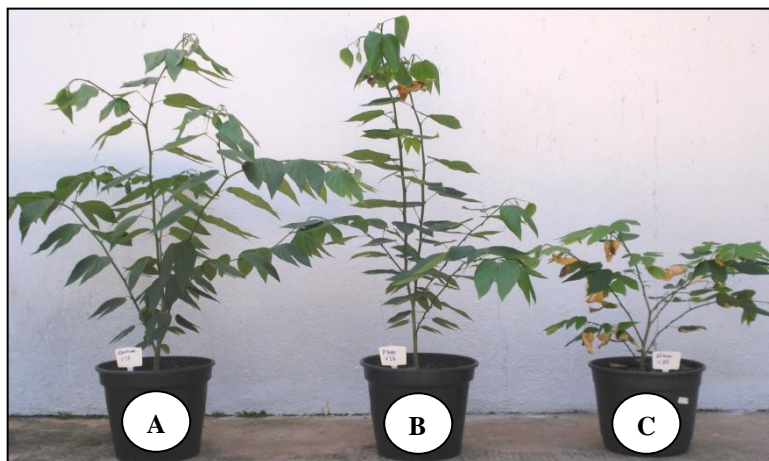


Figura 12 - Plantas de *Bauhinia forficata* aos 90 dias de experimento após retorno das regas diárias nos tratamentos controle (A), 7D (B) e 15D (C)

A exemplo do observado para a área foliar, o ganho de massa seca de folhas, caules e raízes (figura 13) foram reduzidos nos tratamentos 7D e 15D, com diferenças significativas observadas a partir do 45º dia em folhas, caules e em raízes somente aos 75 dias de experimento. Ressalta-se que a plantas sob o regime de rega 7D conseguiram manter taxas de crescimento semelhantes às do controle, a despeito dos baixos valores (-2,0 a -3,0 MPa) de Ψ_{wf} (figura 4) observados já a partir do 30º dia, indicando alta tolerância das plantas de *B. forficata* ao déficit hídrico imposto.

Interessante observar também que em comparação com folhas e caules, o crescimento do sistema radicular das plantas 7D e 15D foram menos afetados pelo déficit hídrico imposto, com valores estatisticamente semelhantes às plantas do controle, com diferenças significativas aparecendo somente aos 75 dias, conforme já mencionado. Tal comportamento é importante na manutenção da área absorvente na tentativa de diminuir os efeitos da baixa disponibilidade de água no solo. De fato a redução da área foliar, que por seu turno levam a reduções nas taxas fotossintéticas devido a diminuição no número de folhas e da produção e tamanho de novas folhas reduz a biomassa foliar refletindo na queda na produção da biomassa total da planta (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; BREVEDAN; EGLI, 2003). Além disso, a diminuição do crescimento da parte aérea, principalmente devido à redução da área foliar, pode ser importante estratégia para as plantas sob déficit hídrico, pois permite uma redução da superfície transpirante (ASHRAF; FOOLAD, 2007) permitindo reestabelecer um balanço com a superfície absorvente, em contato com o solo.

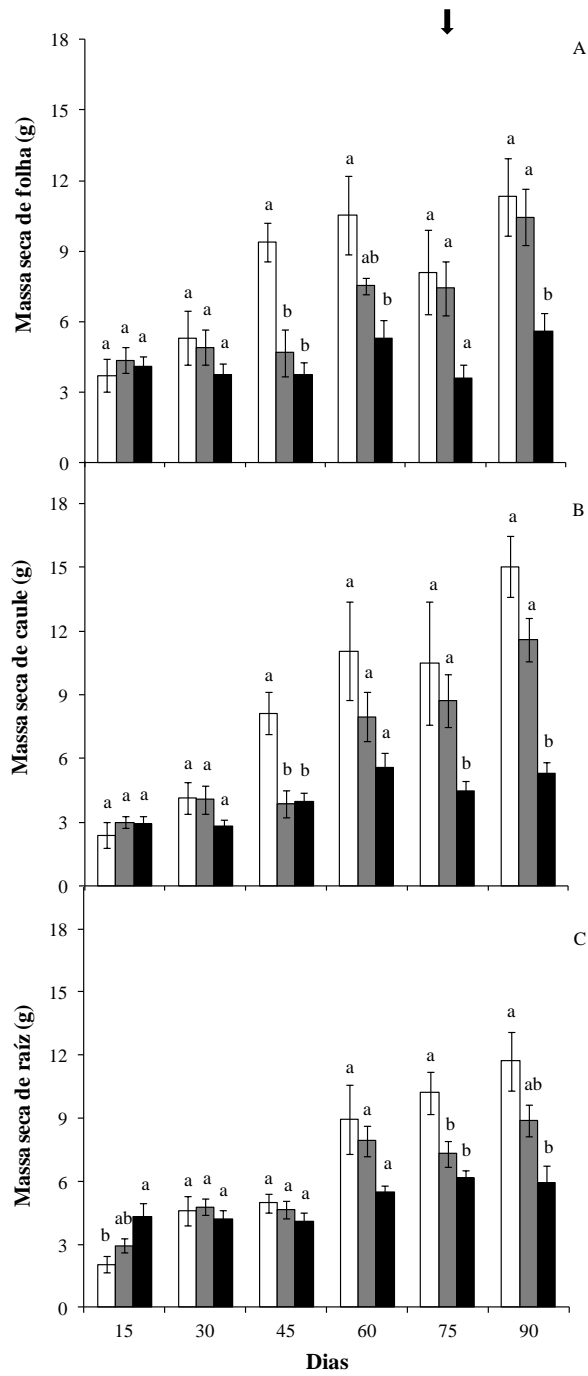


Figura 13 - Conteúdo de massa seca (MS, g) de folhas (A), caules (B) e raízes (C) das plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=5). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

4.2 Influência do déficit hídrico nos teores e perfil de carboidratos e de prolina

A importância da disponibilidade hídrica na manutenção do crescimento e da fotossíntese das plantas de *B. forficata*, também pode ser observada no acúmulo de carboidratos destas plantas. Os teores de açúcares solúveis totais (AST) nas folhas (figura 14A) das plantas do controle, variou entre 60 e 80 mg g⁻¹MS sendo os menores teores de AST observados ao final do experimento, coincidindo com os maiores valores de crescimento, correlacionando-se inversamente e significativamente com a altura ($r = -0,810$, $p = 0,049$), AFT ($r = -0,790$, $p = 0,060$), e massa seca de folhas ($r = -0,849$; $p = 0,034$), caules ($r = -0,889$; $p = 0,018$) e raízes ($r = -0,850$; $p = 0,031$).

Neste mesmo sentido, observa-se que aos 45 dias de experimento, período que foi precedido de reirrigação de todas as plantas dois dias antes da coleta, as plantas do tratamento 7D apresentaram um aumento dos AST (93 mg g⁻¹MS) em relação ao observado nas plantas controle (68 mg g⁻¹MS). Conforme já demonstrado, essa reirrigação nos tratamentos 7D e 15D permitiu a recuperação do Ψ_{wf} (figura 4) e de taxas de A positivas (figura 5).

Outro aspecto a destacar é um estreito paralelismo entre as curvas A_{xPAR} (figura 5), valores de A_{max} (figura 8), e teor de ASTs após o retorno da irrigação diária a partir do 75º dia (últimos 15 dias de experimento), em que as plantas que experimentaram os regimes de rega de 7D e 15D apresentaram valores maiores de AST (75 e 90 mg g⁻¹MS respectivamente) que as do controle, sugerindo que a curto prazo a concentração de AST nas folhas depende da fotossíntese, i.e. da síntese *de novo* e não de uma possível degradação de reserva transitória, como o amido. Segundo Melo et al. (2007), a diminuição dos AST em condições de deficiência hídrica pode ser um indicativo de um baixo potencial osmorregulador das plantas, e possivelmente, esta diminuição está associada ao consumo destes compostos para a manutenção da sobrevivência. Além disso, os açúcares solúveis e outros carboidratos em folhas de plantas sob déficit hídrico podem ser alterados quantitativamente quanto qualitativamente, podendo atuar como um sinal metabólico na resposta ao estresse (AKINCI; LÖSEL, 2009; CHAVES, MAROCO; PEREIRA, 2003; JANG; SHEEN, 1994).

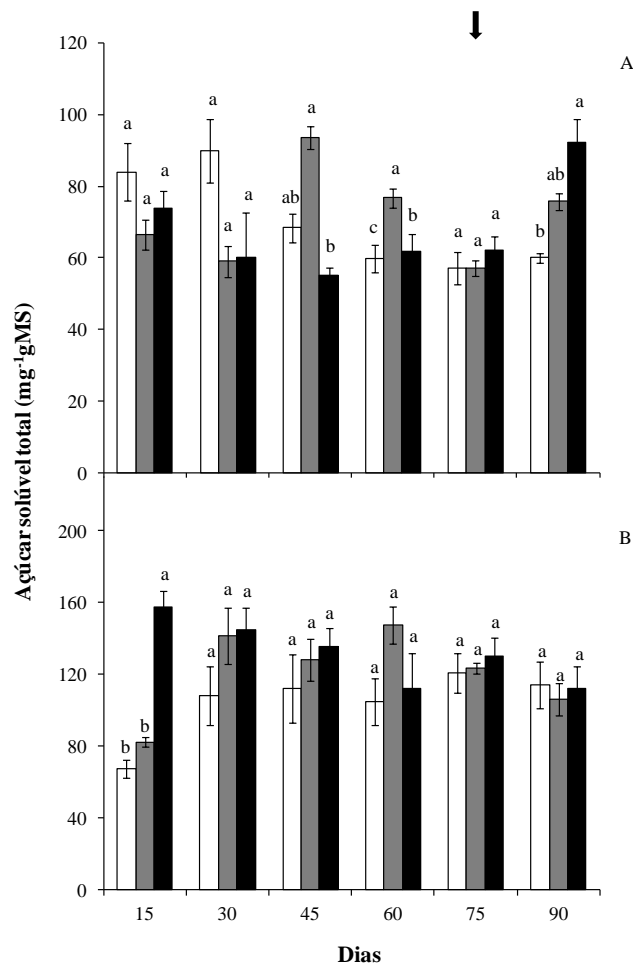


Figura 14 - Conteúdo de Açúcares Solúveis Totais (AST, mg^{-1}gMS) de folhas (A) e raízes (B) em plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média ($n=3$). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Os teores de açúcares redutores (AR) são apresentados na figura 15. Apesar de constituírem formas de carboidratos facilmente mobilizáveis para a produção de energia na respiração e altamente higroscópicos, com ótima função osmorreguladora, os AR apresentaram pequenas variações entre os tratamentos ao longo do experimento tanto em folhas como em raízes, com leve tendência de aumento dos teores de AR em folhas nos tratamentos 7D a partir do 30º dia e 15D a partir do 45º dia, com diferenças significativas entre os três tratamentos observadas aos 60 dias de experimento, porém, não apresentando correlações significativas com os demais parâmetros avaliados.

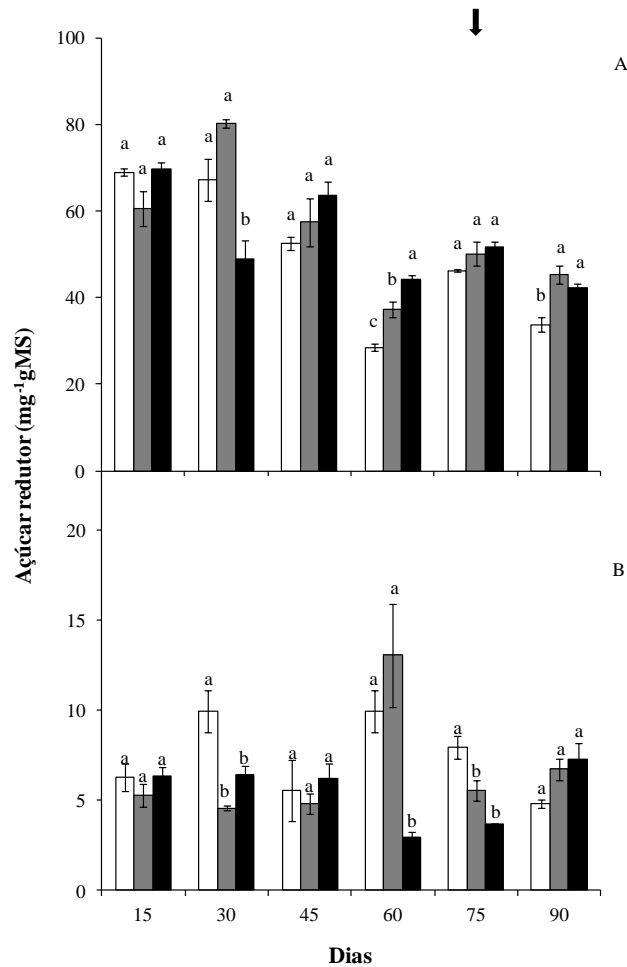


Figura 15 - Conteúdo de Açúcares Redutores (AR, mg⁻¹gMS) de folhas (A) e raízes (B) em plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=3). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

Por outro lado, a exemplo do observado para os AST foliares, os teores de AR correlacionaram-se de forma inversa e significativamente com a altura ($r = -0,800$; $p = 0,050$), AFT ($r = -0,900$; $p = 0,015$), MS_f ($r = -0,930$; $p = 0,008$), MS_c ($r = -0,919$; $p = 0,009$) e MS_r ($r = -0,860$; $p = 0,028$) indicando a pronta utilização destes carboidratos no crescimento das plantas sob ótima disponibilidade hídrica.

Os maiores valores bem como o acúmulo considerável dos teores de amido (S) nas folhas das plantas controle (figura 16A) no decorrer do experimento, em relação às plantas dos tratamentos 7D e 15D, sugerem mais uma vez a forte influência da disponibilidade hídrica sobre as taxas fotossintéticas, determinando a produção de fotoassimilados e por extensão, a produção de reservas na forma de amido. No controle os teores de amido alcançaram valores de 218 mg g⁻¹ MS, correspondendo a ca. de 20% da massa seca das folhas, enquanto que nos tratamentos 7D e 15D os valores máximos foram de 80 e 70 mg g⁻¹ MS.

Segundo Zeeman, Kossmann e Smith (2010), nas folhas, uma certa fração do carbono assimilado na fotossíntese é retido nos cloroplastos na forma de amido em vez de ser convertido em sacarose para exportação para os sítios de crescimento.

Há que se considerar aqui que estes altos teores de amido nas folhas do tratamento controle pode causar uma retroinibição da fotossíntese (HIGUCHI, HUTSONOMIYA, SAKURATANI et al., 1998; AZCÓN-BIETO, 1983) explicando em certa extensão a tendência na queda das taxas de A em resposta à radiação fotossinteticamente ativa e os menores valores de A_{\max} observados aos 90 dias de experimento. A formação de amido nos cloroplastos e o desvio do CO_2 fixado para a síntese de amido podem causar, respectivamente, decréscimo na atividade catalítica da rubisco (GRUB; MÄCHLER, 1990) e inibição da síntese de sacarose citossólica, que, por sua vez, limitaria a fotossíntese por meio da restrição de fosfato para os cloroplastos (GOLDSCHMIDT; HUBER, 1992; LABATE; LEEGOOD, 1988; FOYER, 1987). Assim, pode-se considerar que o acúmulo de amido observado em folhas de *B. forficata* seria uma importante causa da inibição da fotossíntese.

Apesar de apresentar teores de amido bem abaixo daqueles observados nas folhas, nas raízes (figura 16B), o aspecto interessante a destacar é a manutenção do acúmulo de amido nas plantas do tratamento 7D e em geral com valores maiores que aqueles observados nas raízes das plantas do controle. O acúmulo ou manutenção deste carboidrato nas raízes pode constituir, sob condições de déficit hídrico, uma ótima fonte de monossacarídeos, neste caso, glucose, para a manutenção do crescimento radicular (figura 13C), mesmo sob taxas fotossintéticas mínimas. Já no tratamento 15D, observa-se tanto em folhas como em raízes a forte influência negativa deste regime hídrico no acúmulo deste carboidrato. Há que se considerar, no entanto, que os baixos teores de amido em folhas nos tratamentos 7D e 15D podem explicar a manutenção dos teores de AST semelhante ao controle, bem como seu aumento após o retorno das regas diárias os quais poderiam ser prontamente utilizados na osmorregulação e concomitante retomada do crescimento das plantas, uma vez que, o fornecimento de carbono a partir do amido, pode ser vital para o crescimento normal da planta (ZEEMAN, KOSSMANN, SMITH, 2010). Vale ressaltar que a tendência progressiva no acúmulo de amido nas raízes das plantas do tratamento 7D sugerem sua influência na manutenção do crescimento dessas plantas, uma vez que estas mantiveram seu crescimento em altura (figura 10), aumento da área foliar total (figura 11) e acúmulo em massa seca de folhas, caule e raízes (figura 13).

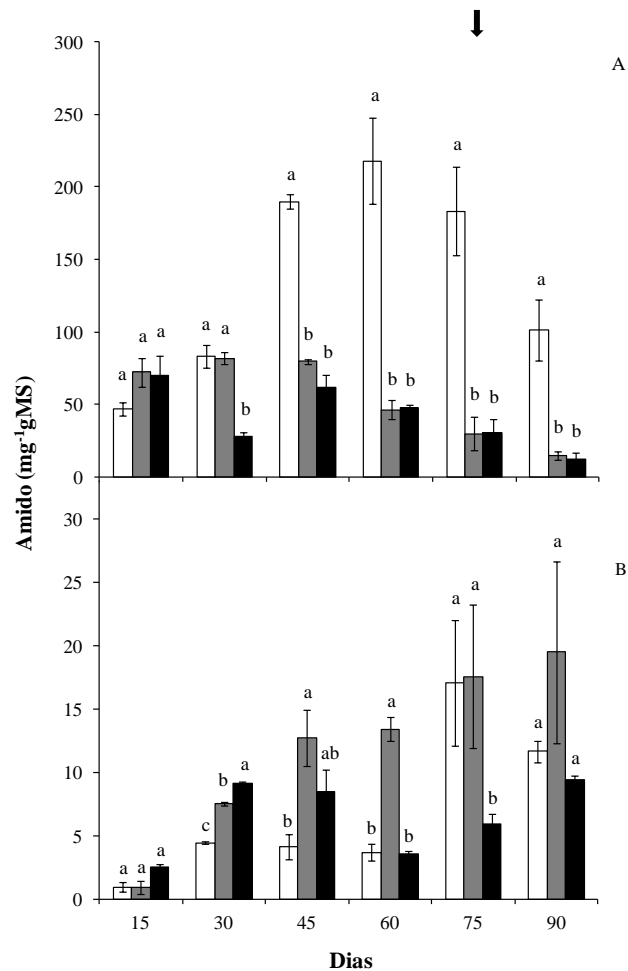


Figura 16 - Conteúdo de amido (S, mg⁻¹gMS) de folhas (A) e raízes (B) em plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=3). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

A exemplo do observado para a fotossíntese, crescimento e teores de carboidratos, o déficit hídrico afetou os níveis de prolina e os resultados sugerem que este aminoácido pode constituir importante resposta das plantas de *B. forficata* ao estresse hídrico (figura 17A e B).

Nas plantas do controle, os níveis de prolina (Pro) permaneceram praticamente inalterados durante o decorrer do experimento (figura 17). Aos 15 dias após a imposição do déficit hídrico, apenas as plantas do tratamento 15D apresentaram diferença estatística no acúmulo de prolina em relação ao grupo controle e ao 30º dia de experimento, esse valores aumentaram consideravelmente, principalmente nas folhas, chegando a 64 μmol/gMS.

A reirrigação 2 dias antes da coleta do 45º dia estimulou o catabolismo de prolina nos tratamentos 7D e 15D, principalmente em folhas, vez que, essa reirrigação foi insuficiente para diminuir os níveis de prolina nas raízes das plantas do tratamento 15D, que mantiveram

valores significativamente maiores que os demais tratamentos (8,5 $\mu\text{mol/gMS}$). Segundo Krasensky e Jonak (2012), condições de estresse estimulam a biossíntese de prolina, enquanto seu catabolismo é reforçado durante a recuperação após um período de estresse.

Essa tendência no acúmulo de prolina em plantas sob déficit hídrico tem sido comumente relatada. A prolina contribui na tolerância da planta à deficiência hídrica por meio de aumento no potencial osmótico (Ψ_o) atuando como um osmólito, além de atuar como reserva de nitrogênio para síntese de enzimas específicas, um eliminador de espécies reativas de oxigênio, e como uma chaperona molecular estabilizando estruturas proteicas protegendo as células contra os danos causados por estresses abióticos (KRASENSKY; JONAK, 2012; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; MANDAN et al., 1995; NAVARI-IZZO, QUARTACCI, IZZO, 1990).

Mais um indício de que o aumento nos níveis de prolina é uma resposta ao déficit hídrico imposto, é que tanto com a re-irrigação aos 45 dias, como o retorno das regas diárias a partir do 75º dia de experimento, os níveis de prolina das plantas dos tratamentos 7D e 15D diminuíram e se igualaram as plantas do controle. O mesmo padrão foi observado em *Sesuvium portulacastrum* (Bredo-da-praia), onde os níveis de prolina decresceram rapidamente, atingindo valores próximos aos das plantas controle em experimento para avaliar o efeito do déficit hídrico e no metabolismo de prolina dessa espécie (SLAMA et al. 2006). De modo oposto, Horta (2012) observou que em *Swietenia macrophylla* (Mogno) os níveis de prolina não foram significativamente alterados em folhas e raízes, independente da intensidade do déficit hídrico.

Os resultados demonstram ainda certa relação entre os níveis de prolina e a intensidade do déficit hídrico imposto às plantas, porém, correlações significativas entre a variação nos teores de prolina, umidade do solo e Ψ_w tanto em das folhas ($r = -0,810$; $p = 0,050$ e $r = -0,890$; $p = 0,017$) como em raízes ($r = -0,880$; $p = 0,020$ e $r = -0,930$; $p = 0,008$) foram respectivamente observadas somente no tratamento 7D.

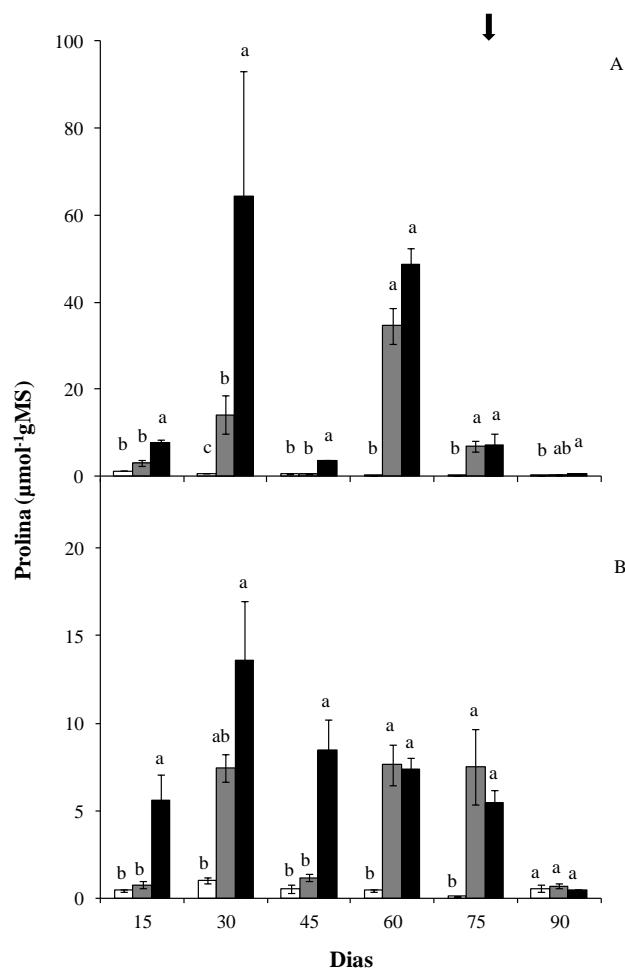


Figura 17 - Conteúdo de prolina (Pro, $\mu\text{mol}^{-1}\text{gMS}$) de folhas (A) e raízes (B) em plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle - □) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■). A seta indica o dia do retorno das irrigações diárias nos tratamentos 7D e 15D. Barras indicam o erro padrão da média (n=3). Médias seguidas de mesma letra em cada coleta não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade

A análise qualitativa dos carboidratos solúveis neutros por cromatografia de troca aniônica (HPAEC/PAD) em folhas (figuras 18) e raízes (figuras 19) de plantas de *B. forficata* demonstrou a presença de *mio*-inositol, glucose, frutose e sacarose, como principais açúcares solúveis. O teor de glucose sempre foi elevado nas plantas irrigadas diariamente (controle) e não sofreu muitas mudanças nas plantas sob déficit hídrico (7D e 15D) até os 30 dias de experimento. Por outro lado, o teor de sacarose aumenta com o déficit hídrico (15D) após 30 dias do início do experimento (figura 18 – 30 dias). O *mio*-inositol sempre esteve elevado em todas as folhas das plantas, tanto para o controle como para os tratamentos. Jaindl e Popp (2006) sugeriram que o acúmulo de ciclitóis em plantas, incluindo sementes, é uma resposta generalizada de proteção contra diversos estresses ambientais.

Ao contrário que se esperava em folhas, o conteúdo dos açúcares solúveis totais (AST) (figura 14) não apresentou alterações entre as plantas irrigadas diariamente como as

sob déficit hídrico, havendo alterações mais significativas apenas nos teores de sacarose nas plantas sob déficit.

Por outro lado, a raiz sendo o principal órgão sensível do déficit hídrico, seu crescimento geralmente torna-se mais acentuado sob tais condições para aumentar a habilidade do vegetal em absorver água a partir da solução do solo (PACE et al., 1999). Entretanto, aos 15 dias de experimento, as raízes das plantas com maior déficit (15D) já apresentaram teores mais elevados de *mio*-inositol, glicose, frutose e sacarose quando comparadas com as plantas do controle e 7D, com exceção da glicose que aos 15 dias estava em maior teor nas plantas controle. Segundo Spollen e Nelson (1994), os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose, a tendência no aumento na concentração de sacarose nas raízes sugere a atuação de carboidrato na osmorregulação celular das plantas sob déficit hídrico.

Plantas de *B. forficata* sob déficit hídrico apresentaram um aumento nos teores de *mio*-inositol, glicose, frutose e sacarose nas raízes. Entretanto, o retorno das regas diárias após os 75 dias de experimento nas plantas tratadas (7D e 15D) permitiu a volta das taxas fotossintéticas (figura 5) e, concomitantemente, as análises por HPAEC/PAD mostraram uma queda nos teores de glicose, frutose e sacarose nas raízes das plantas tratadas (figura 18) indicando o consumo desses carboidratos nas atividades metabólicas das plantas.

A alta detecção de *mio*-inositol nestas análises sugerem que os açúcares alcoóis podem constituir grande parte dos ASTs não redutores em folhas e raízes de *B. forficata*. O *mio*-inositol, além de ser o mais abundante inositol em células vegetais é o precursor dos açúcares alcoóis, tendo importantes funções de reserva e osmorreguladora em condições de estresse (KLAGES, BOLDINGH, SMITH, 1999).

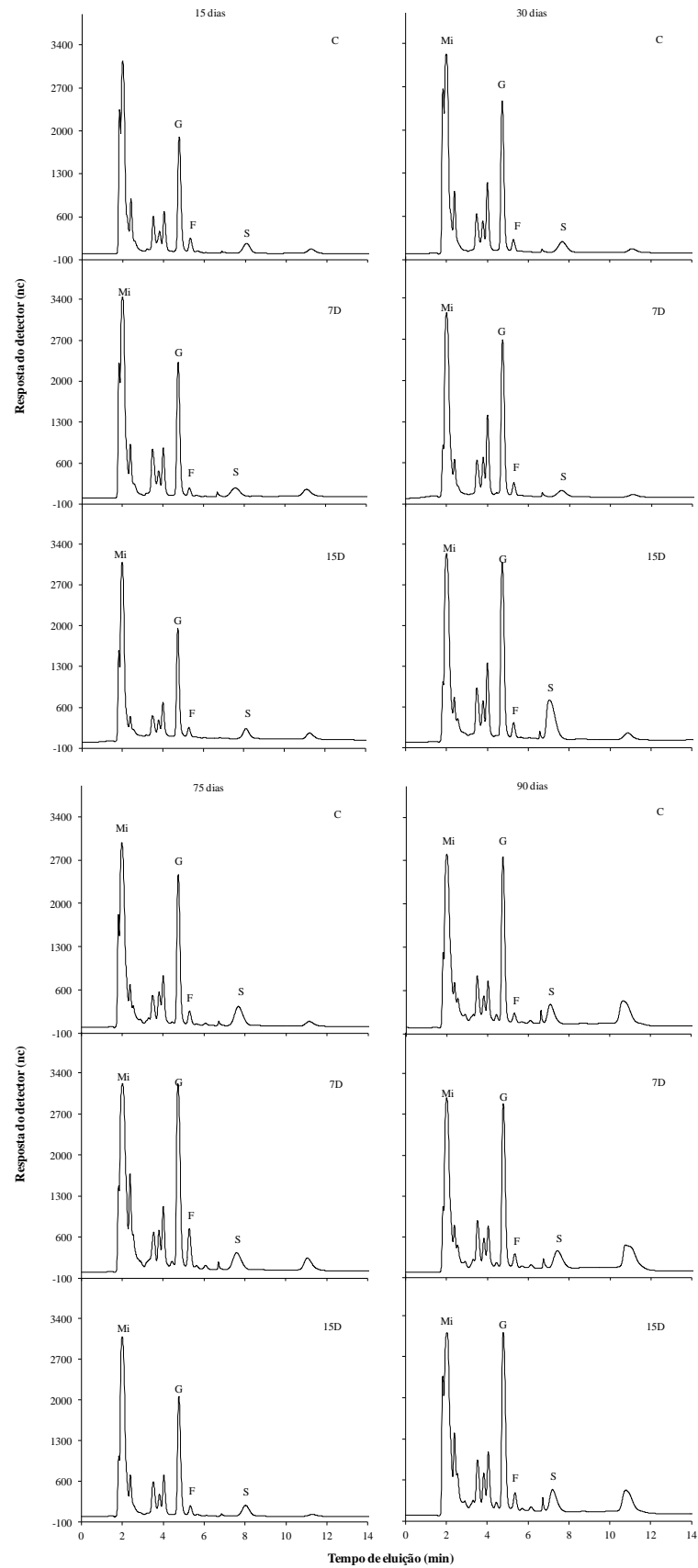


Figura 18 - Análise por HPAEC/PAD dos açúcares solúveis de folhas das plantas de *Bauhinia forficata* irrigadas diariamente (controle – C), a cada 7 dias (7D) e a cada 15 dias (15D) aos 15, 30, 75 e 90 dias de experimento. Mi: Mio-inositol; G: Glucose; F: Frutose; S: Sacarose

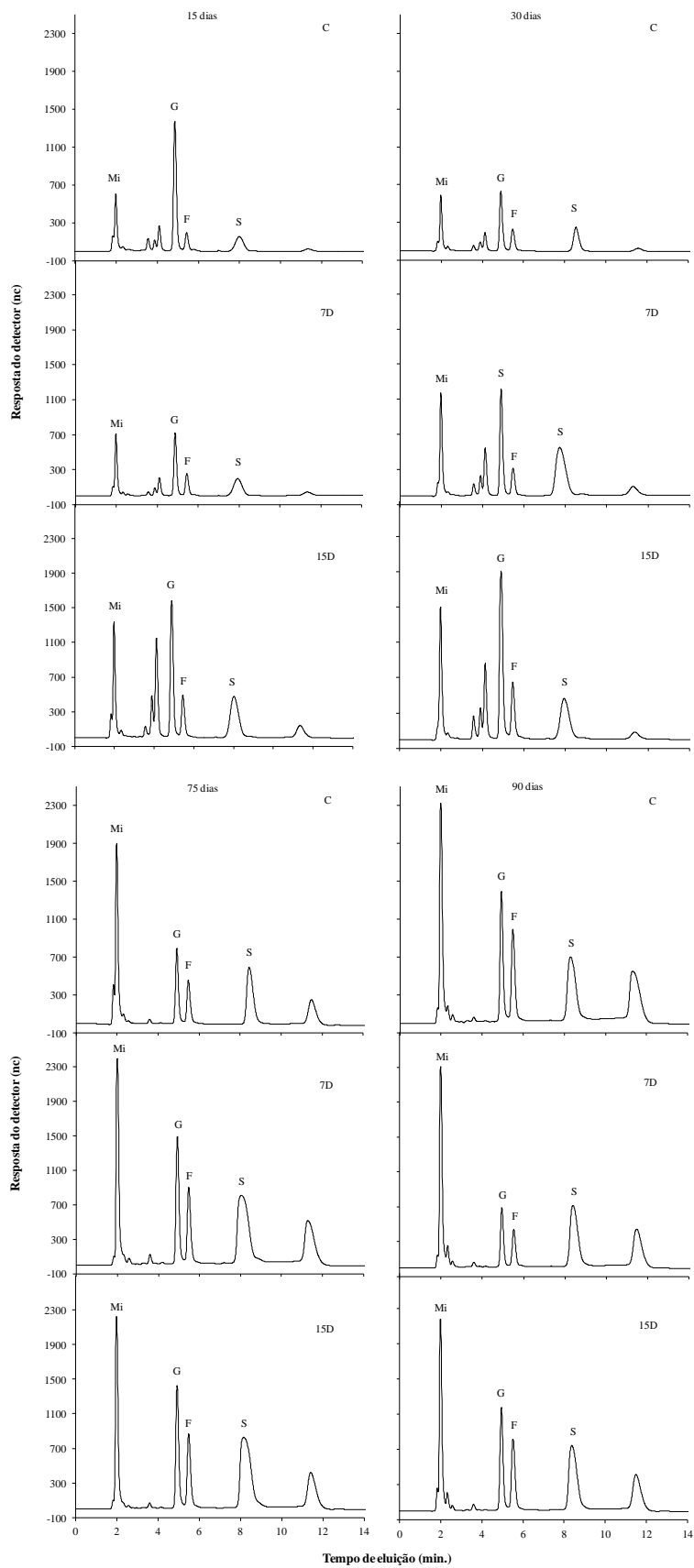


Figura 19 - Análise por HPAEC/PAD dos açúcares solúveis de raízes das plantas de *Bauhinia forficata* irrigadas diariamente (controle - C), a cada 7 dias (7D) e a cada 15 dias (15D) aos 15, 30, 75 e 90 dias de experimento. Mi: Mio-inositol; G: Glucose; F: Frutose; S: Sacarose

As análises por GC/MS de açúcares álcool de folhas (figura 20) e raízes (figura 21) de *B. forficata* mostraram que a alta detecção nos níveis de *mio*-inositol observada na análise por HPAEC/PAD segere ser o conjunto dos açúcares galactinol, galactosilglicerol, glicerol, *mio*-inositol e D-pinitol.

Detectou-se nas análises de CG/MS (figura 20 e 21) uma alta concentração de D-pinitol nas plantas do controle e, em menores níveis, nas plantas dos tratamentos 7D e 15D. O D-pinitol constitui um princípio ativo encontrado em plantas antiglicemiantes, como *B. forficata*, exercendo efeitos do tipo insulina em animais e por isso vem sendo utilizado para o tratamento alternativo do Diabetes. A atividade tipo insulina do D-pinitol pode ser explicada pelo fato dele ser um composto análogo ao inositol, participando como um segundo mensageiro na cascata de sinalização desencadeada pela insulina em animais (BATES, JONES, BAILEY, 2000).

O D-pinitol é formado diretamente pela metilação de *mio*-inositol, que é sintetizado a partir da glicose, sendo encontrado em várias partes das plantas, como folhas, raízes e sementes (ALMEIDA et al., 2003; LOEWUS; MURTHY, 2000; KUO, LOWELL, NELSEN et al., 1997). Duas funções principais têm sido propostas para a presença de *mio*-inositóis em plantas superiores (LOESCHER, 1987; DREW 1983; BIELESKI, 1982). Como forma de transporte e armazenamento de açúcares fotossinteticamente derivados e o fato desses compostos atuarem como solutos compatíveis com o ajuste osmótico em tecidos de plantas em resposta a déficit hídrico ou alta salinidade (BIELESKI, CLARK, KLAGES, 1997; LOESCHER, 1987). Um estudo conduzido por Warren, Aranda e Cano (2011) mostrou que em *Acacia mangium* (Acácia australiana) e *Acacia maidenii* (Acácia) submetidas ao déficit hídrico, ocorre aumento nos níveis de pinitol e um constante decréscimo em seu precursor ononitol.

Segundo Murakeözy et al. (2002), D-pinitol é encontrado principalmente em plantas submetidas a estresses, entretanto, nesse estudo, os maiores níveis de D-pinitol foram encontrados nas plantas sob regas diárias, nas quais não passaram por déficit hídrico, sugerindo que esse composto atuou apenas na forma de transporte e armazenamento de açúcares, visto que o trabalho realizado por Oliveira et al. (2004) sugere que D-pinitol estimulou o aumento e ganho de massa do eixo hipocótilo-radícula e de epicótilos de *Canavalia ensiformis* (Feijão-de-porco). Além disso, trabalhos sugerem que D-pinitol pode estimular a mobilização de amido devido o aumento na atividade da enzima α -amilase

(RIBEIRO et al., 2011; SOUZA, 2010). Sendo assim, essas informações sugerem que os altos níveis de D-pinitol nas plantas controle podem ter influenciado no acúmulo de amido (figura 16) nessas plantas.

Entretanto, a tendência no acúmulo de galactinol, galactosilglicerol e glicerol nas plantas dos tratamentos 7D e 15D durante o período da imposição de déficit hídrico e a diminuição desses açúcares alcoóis após a reirrigação e regas diárias (90 dias) sugerem que esses compostos colaboraram no ajustamento osmótico das plantas induzidas ao estresse, pois, como relatado por Nishizawa, Yabuta e Shigeoka (2008), o galactinol protege as plantas contra radicais hidroxila de possíveis danos oxidativos causados por estresses abióticos.

Além disso, a maioria das células são sensíveis a desequilíbrios osmóticos e, quando submetidas a um aumento na osmolaridade extracelular perdem água. Para se adaptarem a variações osmóticas, as células acumulam pequenas moléculas orgânicas, como glicerol, que lhes permitem equilibrar sua pressão osmótica com a do ambiente externo (de NADAL, ALEPUZ, POSAS, 2002).

Estudo realizado por Sziderics et al. (2010), com *Capsicum annuum* (Pimentão) sob déficit hídrico mostrou uma tendência no aumento nos níveis de galactinol tanto nas folhas como nas raízes das plantas sob déficit, sendo que os níveis de inositol, pinitol e manitol não foram alterados significativamente. Em contra partida, um estudo conduzido por Pattanagul e Madore (1999), com *Coleus blumei* (Coléus) sob déficit hídrico mostraram queda nos níveis de galactinol nas plantas sob déficit e aumento de 3 vezes nos níveis de *O*-metil-inositol. Para esses autores, a ativação da enzima *mio*-inositol 6-*O*-metil transferase (IMT), juntamente com a seca induzida, reduziram a atividade da enzima galactinol-sintase (GS) limitando a formação de galactinol. Santos et al. (2011), mostrou que em *Coffea arabica* (Café) sob déficit hídrico ocorre diminuição nos teores de galactinol, mas um significativo aumento nos níveis de estaquiase e baixos teores de rafinose, onde esses autores sugerem que provavelmente a estaquiase desempenha uma importante função como protetor contra eventuais danos causados pelo estresse hídrico.

Considerando os maiores níveis de D-pinitol nas plantas de *B. forficata* irrigadas diariamente em relação às plantas dos tratamentos 7D e 15D, que por sua vez, apresentaram aumento nos níveis de galactinol, sugere-se que a rota de biossíntese desses compostos possa ter sido alterada devido influência do déficit hídrico, onde nesse caso, o precursor *mio*-inositol seria preferencialmente utilizado na síntese de galactinol nas plantas sob déficit para auxiliar

no ajustamento osmótico celular dessas plantas, ao invés de D-pinitol, o qual foi detectado em altas quantidades em *B. forficata* sob condições de ótima disponibilidade hídrica.

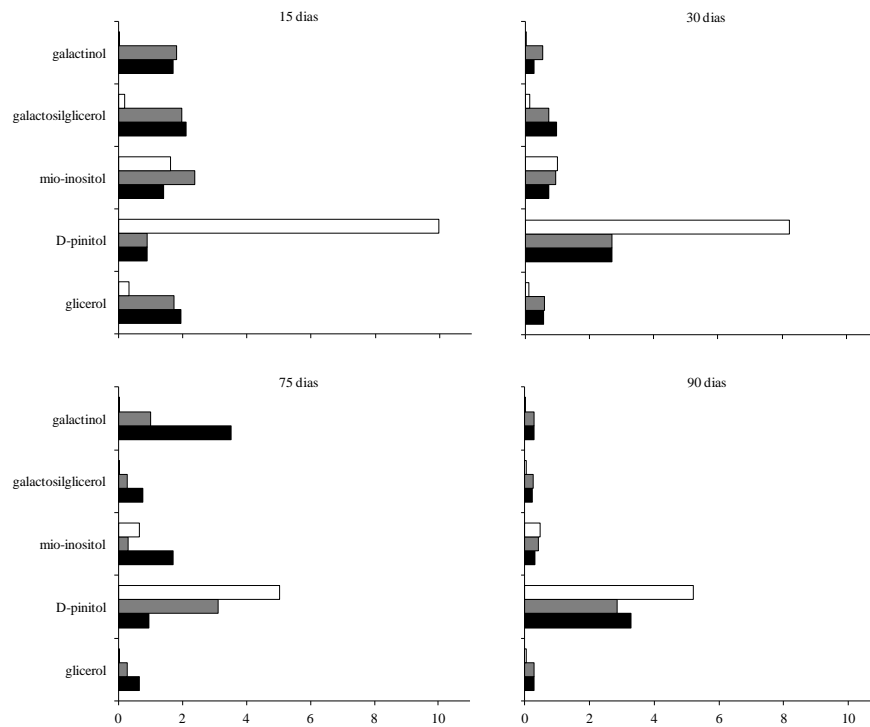


Figura 20 - Análise por GC/MS de açúcares alcoóis de folhas das plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■) aos 15, 30, 75 e 90 dias de experimento. Os valores foram normalizados em função dos valores obtidos para os controles

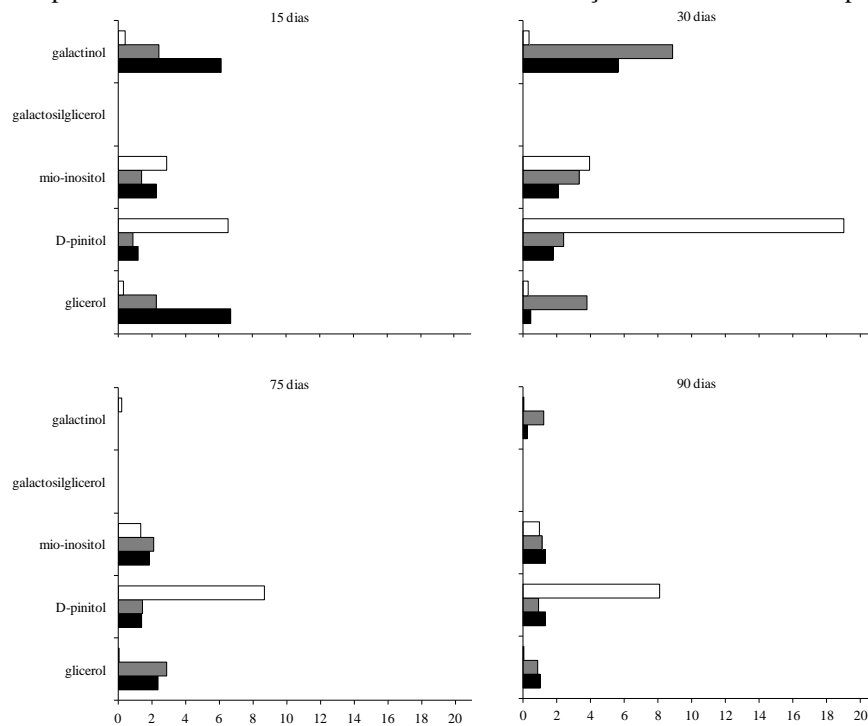


Figura 21 - Análise por GC/MS de açúcares alcoóis de raízes das plantas de *Bauhinia forficata* submetidas aos regimes de regas diária (Controle -□) e regas a cada 7 (7D - ■) e 15 dias (15D - ■) aos 15, 30, 75 e 90 dias de experimento. Os valores foram normalizados em função dos valores obtidos para os controles

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que a intensidade e duração do déficit hídrico imposto às plantas de *B. forficata* afetou a fotossíntese, acúmulo de carboidratos com reflexos de curto prazo no crescimento das plantas.

A fotossíntese de *B. forficata* é altamente dependente da disponibilidade hídrica do solo, porém, com alta capacidade de recuperação das taxas fotossintéticas já aos 15 dias após o reestabelecimento da disponibilidade hídrica no solo.

Um estreito paralelismo entre o déficit hídrico e as curvas AxPAR, valores de A_{max} , e teores de carboidratos sugere a curto prazo que a concentração de AST nas folhas depende da fotossíntese, i.e., da síntese e não somente de uma possível degradação de reserva, como o amido foliar.

A espécie *B. forficata* apresentou uma utilização versátil dos carboidratos solúveis em resposta ao déficit hídrico, mantendo altos valores de AST e AR, o que sugere um mecanismo de osmorregulação, tanto em folhas como nas raízes, apresentando como principais carboidratos solúveis o *mio*-inositol, glucose, frutose e sacarose.

A detecção de açúcares alcoóis, como o galactinol, galactosilglicerol e glicerol sugerem que essa espécie apresenta um eficiente mecanismo de utilização desses carboidratos em resposta ao déficit hídrico.

Os altos níveis de D-pinitol nas plantas sob regas diárias, associados às reduções deste carboidrato e aumentos nos níveis de galactinol em plantas sob déficit hídrico, sugerem uma influência do estresse hídrico alterando a rota de biossíntese destes açúcares a partir de seu precursor comum, o *mio*-inositol. Tais resultados nos indica um importante aspecto a ser estudado no tema.

Os altos níveis de prolina em plantas sob déficit hídrico indicam que esse aminoácido contribui na estratégia de resposta a este estresse, tal como o ajustamento osmótico e na proteção de estruturas celulares contra oxidação, além de ser um sinalizador de situação de déficit hídrico em *B. forficata*.

A espécie *B. forficata* por sua alta capacidade de tolerar déficits hídricos em estágio breve de desenvolvimento, apresentando rápida recuperação das taxas fotossintéticas com reflexos no acúmulo de carboidratos, apontam para uma alta plasticidade fenotípica, que por

seu turno podem explicar sua ampla ocorrência e distribuição. Além disso, pelos resultados obtidos demonstrarem a ocorrência de altas concentrações de açúcares alcoóis, apresenta-se como um bom modelo para estudos destes carboidratos, bem como, sobre mecanismos de defesa antioxidativa e estudos sobre síntese e transporte de ABA como sinalizador de estresse em plantas.

REFERÊNCIAS

- AKINCI, S.; LÖSEL, D.M. The soluble sugars determination in Cucurbitaceae species under water stress and recovery periods. **Advances in Environmental Biology**, Jordan, v.3, n. 2, p. 175-183, May-Aug. 2009.
- ALIA, M. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline. In: ANNUAL USER MEETING OF THE FREE RADICAL RESEARCH FACILITY DARESBURY, 2003. Cheshire. **Proceedings...** Cheshire: Council for the Central Laboratory of the Research Councils, 2003.
- ALIA, P.; SARADHI, P.; MOHANTY, P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 38, n. 2/3, p. 253–257. Apr. 1997.
- ALMEIDA, M.V. de; SILVA, A.D. da; SOUZA, M.V.N. de; BENÍCIO, A.A.A. A cascata de sinalização dos fosfoinosítídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n.1, p. 105-111. Jan-Fev. 2003.
- AMARAL, L.I.V.; COSTA, P.M.F.; AIDAR, M.P.M.; GASPAR, M.; BUCKERIDGE, M.S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, v. 4, p. 425-431, 2007.
- ASEGA, A.F.; CARVALHO, M.A.M. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 42, n. 4, p. 313-319. Apr. 2004.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 206–216. Mar. 2007.
- ASSENG, S.; RITCHIE, J.T.; SMUCKER, A.J.M.; ROBERTSON, M.J. Root growth and water uptake during water deficit and recovering in wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, n.2, p. 265–273. Apr. 1998.
- AYRES, M.; AYRES J.R.; AYRES, D.L.M.; SANTOS, A.S. **BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290p.
- AZCÓN-BIETO, J. Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, n. 3, p. 681-686. Nov. 1983.

BAJJI, M.; LUTTS, S.; KINET, J.M to . Water deficit effects on solute contribution osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 4, p. 669–681, Mar. 2001.

BALLANTYNE, J.S.; CHAMBERLIN, M.E. Regulation of cellular amino acid levels. In: STRANGE, K. (Ed). **Cellular and molecular physiology of cell volume regulation**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 111-122.

BASU, P.S.; BERGER, J.D.; TURNER, N.C.; CHATURVEDI, S.K.; ALI, M.; SIDDIQUE, K.H.M. Osmotic adjustment of chickpea (*Cicer arietinum*) is not associated with changes in carbohydrate composition or leaf gas exchange under drought. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 150, n. 2, p. 217-225. Apr. 2007.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 205-207. 1973.

BATES, S.H.; JONES, R.B.; BAILEY, J.C. Insulin-like effect of D-pinitol. **British Journal of Pharmacology**, Oxford, v. 130, n. 8, p. 1944-1948. Aug. 2000.

BIELESKI, R.L. Sugar alcohols. In: LOEWUS, W.T. (Ed.), **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series. Springer-Verlag, Berlin, 1982. p. 158-192.

_____ ; CLARK, C.J.; KLAGES, K.U. Identification of *myo*-inositol as a major carbohydrate in kiwifruit, *Actinidia deliciosa*. **Phytochemistry**, New York, v. 46, n.1, p. 51-55. Sep. 1997.

BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In BELHASSEN, I. (Ed), **Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis**. Dordrecht :Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 57-70.

BOHRNETT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, Maryland, v. 14, n.3, p. 89-97. Mar. 1996.

BREVEDAN, R.E.; EGLI, D.B. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence and yield of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 6, p. 2083–2088. Nov-Dec. 2003.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS, H.P. dos; LIMA, D.U. de. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, p. 137-162. 2000.

CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 275-280. Dec. 1998.

_____; Z Aidan, L.B.P.; DiETRICH, S.M.C. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, Lancaster, v. 136, n.1, p.153-161. May 1997.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551–560. Feb. 2009.

_____. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 1–16. Jan. 1991.

_____; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 30, n.3, p. 239-264. 2003.

_____; PEREIRA, J.S. Water Stress, CO₂ and Climate Change. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 1131-1139. Aug. 1992.

_____; PEREIRA, J.S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M.L.; RICARDO, C.P.P.; OSORIO, M.L.; CARVALHO, I.; FARIA, T.; PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, n. 7, p. 907–916, June 2002.

CHEN, C.; KAO, C.H. Osmotic stress and water stress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 197-202. Aug. 1993.

CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 241-249. Sep. 2002.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, California, v. 23, n. 3, p. 458-460. May 1975.

COSTA, G.F. da; MARENCO, R.A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 2, p. 229-234. June 2007.

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

de NADAL, E.; ALEPUZ, P.M.; POSAS, F. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. **EMBO reports**, Heidelberg, v. 3, n. 8, p. 735-740. Aug. 2002.

DORE, M.H.I. Climate change and changes in global precipitation patterns: What do we know? **Environmental International**, New York, v. 31, n. 8, p. 1167-1181. Oct. 2005.

DREW, E.A. Sugars, cyclitols and seagrass phylogeny. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 387-408. Apr. 1983.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 747-753. Aug. 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356. Mar. 1956.

ENGEL, I.C.; FERREIRA, R.A.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n.2, p. 258-264. Abr-Jun. 2008.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P.M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increase lignin metabolism and progressive stellar accumulation of wall phenolics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 2, p. 603-612. Feb. 2006.

_____; NEUMANN, P.M. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 4, p. 2291-2300. Aug. 2004.

FARIA, R.A.P.G.; ANDRADE-NETO, M.; PINTO, L.S.; CASTELLÓN, R.R.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 3. Sep. 2004.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 159-166. 1986.

FORTUNATO, R.H. Revision del genero *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioidea, Fabaceae) para La Argentina. **Darwiniana**, San Isidro, v.27, n. 1/4, p. 527-557,1986.

FOYER, C.H. The basis for source-sink interaction in leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 25, n. 5, p. 649-657,1987.

GEIGENBERGER, P.; REIMHOLZ, R.; GEIGER, M.; MERLO, L.; CANALE, V.; STITT, M. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. **Planta**, Berlin, v. 201, n. 4, p. 502-518. Apr. 1997.

GOLDSCHMIDT E.E.; HUBER S.C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1443– 1448. Aug. 1992.

GOLLAN, T.; RICHARDS, R.A.; PASSIOURA, J.B.; RAWSON, H.M.; MUNNS, R.; JOHNSON, D.A. Soil water status affects the stomatal conductance of fully turgid wheat and sunflower leaves. **Australian Journal Plant Physiology**, Melbourne, v.13, n. 4, p.459-464, 1986.

GRASSI G.; MAGNANI, F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. **Plant, Cell and Environment**, Weinheim, v. 28, n, 7, p. 834–849. July 2005.

GRAZIANO, T.T.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Characterization of starch of the underground system of *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott (Araceae) during plant development. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 4, n. 1, p. 7-10. 1992.

GRUB, A.; MÄCHLER, F. Photosynthesis and light activation of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in the presence of starch. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 1293-1301. Oct. 1990.

HAEYOUNG, L.; YOONGHO, L.; YOUL-HEE, C.; CHUL-HOON, L. Induction of apoptosis in the HepG2 cells by HY53, a novel natural compound isolated from *Bauhinia forficata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 16, n. 8, p. 1262-1268. Aug. 2006.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, n.2, p. 79–102. Feb. 1997.

HIGUCHI, H.; HUTSONOMIYA, N.; SAKURATANI, T. Effects of temperature on growth, dry matter production and CO₂ assimilation in cherimoya (*Annona cherimolla* Mill.) and sugar apple (*Annona squamosa* L.) seedlings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.73, n. 2/3, p.89-97. Mar. 1998.

HORTA, L.P. **Aspectos bioquímicos da resposta de plantas jovens de *Swietenia macrophylla* (Mogno) ao déficit hídrico**. 2012. 73p. Dissertação apresentada (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

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

_____ ; XU, L.K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1595–1616. Sep. 2000.

HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Spatial distributions of inorganic ions and carbohydrates contributing to osmotic adjustment in the elongating wheat leaf under saline conditions. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, n. 5, p. 591–597. 1998.

Intergovernmental Panel on Climate Change: **The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. New York, NY: Cambridge University Press, Cambridge, 2007.

JAINDL, M.; POPP, M. Cyclitols protect glutamine synthetase and malate dehydrogenase against heat induced deactivation and thermal denaturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 345, n. 2, p. 761–765. June 2006.

JANG, J-C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 6, n. 11, p. 1665-1679. Nov. 1994.

JONES, H.G.; CORLETT, J.E. Current topics in drought physiology. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 119, n. 3, p. 291–296. Dec. 1992.

JORDAN, W.R. Whole plant response to water deficits: An overview. In: TAYLOR, H.M.; JORDAN, W.R.; SINCLAIR, T.R. (Ed.). **Limitations to efficient water use in crop production**. Madison: ASA, CSSA;SSA. 1983. p. 289-317.

KAVI KISHOR, P.B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R.N.; SRI LAXMI, R.N.; NAIDU, K.R.; RAO, K.R.S.S.; RAO, S.; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Ist implication in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 3, p. 424–438. Feb. 2005.

KLAGES, K.; BOLDINGH, H.; SMITH, G.S. Accumulation of *myo*-Inositol in *Actinidia* seedlings subjected to salt stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 521–527. May. 1999.

KOSLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. **Physiology of woody plants**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1997. 411p.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 581p.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 4, p. 1593–1608, Feb. 2012.

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, n. 3, p. 413-420, 1998.

KUO, T.M.; LOWELL, C.A.; NELSEN, T.C. Occurrence of Pinitol in developing soybean seed tissues. **Phytochemistry**, New York, v. 45, n.1, p. 29-35. May 1997.

KUSAKA, M.; OHTA, M.; FUJIMURA, T. Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 125, n. 4, p. 474-489. Dec. 2005.

LABATE, C.A.; LEEGOOD, R.C. Limitation of photosynthesis by changes in temperature. **Planta**, Berlin, v. 173, n. 4, p. 519-527. Dec. 1988.

LOESCHER, W.H. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 70, n. 3, p. 53-557. July 1987.

LOEWUS, F.A.; MURTHY, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 150, n. 1, p. 1-19. Jan. 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v. 1, 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 159p. 368p.

LUSA, M.G.; BONA, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 1, p. 196-211. Jan-Mar. 2009.

MADAN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K.; CHOWDHURY, J.B. Proline and proline metabolising enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals of Botany**, London, v. 76, n. 1 p. 51-57. July 1995.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 444, n. 2, p. 139-158. Dec. 2005.

MARUR, C.J.; SODEK, L.; MAGALHES, A.C. Free amino acids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C.; GOMES, M. de M. de A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranja "Valência" sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 29-34. 1999.

MELO, H.C.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A.; ALVES, J.D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, p. 145-153, 2007.

MORGAN, J.M. Osmoregulation and water stress in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 299-319. June 1984.

MORILLON, R.; LASSALLES, J-P. Water deficits during root development: effects on the growth of roots and the osmotic water permeability of isolated root protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 3, p. 392-399. Aug. 2002.

MURAKEÖZY, E.O.; SMIRMOFF, N.; NAGY, Z.; TUBA, Z. Seasonal accumulation pattern of Pinitol and other carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. *Hungarica*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, n. 5, p. 485-490, 2002.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; IZZO, R. Water-stress induced changes in protein and free amino acids in field-grown maize and sunflower. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 28, n.4, p. 531-537, 1990.

NAYYAR, N.; WALIA, D.P. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n.2, p. 275-279. Mar. 2003.

NISHIZAWA, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, n. 3, p. 1251-1263. July 2008.

OLIVEIRA A.E.A.; RIBEIRO, E.S.; DA CUNHA, M.; GOMES, V.M.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Insulin accelerates *Canavalia ensiformis* seeds germination and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 43, n. 1, p. 57-62. May 2004.

OPARKA, K.J.; WRIGHT, K. M. Influence of cell turgor on sucrose partitioning in potato tuber storage tissues. **Planta**, Berlin, v. 175, n. 4, p. 520-52, Oct. 1988b.

_____. Osmotic regulation of starch synthesis in potato tubers. **Planta**, Berlin, v. 174, n. 1, p. 123-126, Apr. 1988a.

OSORIO, J.; OSORIO, M.L.; CHAVES, M.M.; PEREIRA, J.S. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 363–373. June 1998.

PACE, P.F.; CRALLE, H.T.; EL-HALAWANY, S.H.M.; COTHREN, J.T.; SENSEMAN, S.A. Drought-induced changes in shoot and root growth of young cotton plants. **The Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v. 3, n. 4, p. 183-187, 1999.

PATTANAGUL, W.; MADORE, M.A. Water deficit effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 3, p. 987-993, Nov. 1999.

PELLESCHI, S.; ROCHER, J.P.; PRIOUL, J.L. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis on mature maize leaves. **Plant, Cell and Environmet**, Weinheim, v. 20, n. 4, p. 493-503. Apr. 1997.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 869–882, Jan. 2011.

PIRO, G.; LEUCCI, M.R.; WALDRON, K.; DALESSANDRO, G. Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 3, p. 559-569. Sep. 2003.

PORTES, M.T.; ALVES, T.H.; SOUZA, G.M. Water deficit affects photosynthetic induction in *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) and *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) growing in understorey and gap conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Rio Claro, v. 18, n. 4, p. 491-502. Oct-Dec. 2006.

_____; CARVALHO, M.A.M. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different development phases. **Plant Science**, v. 170, n. 3, p. 624-633. Mar. 2006.

RAI, V.K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biologia Plantarum**, Phara, v. 45, n. 4, p. 481-487. Dec. 2002.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell and Environment**, Weinheim, v. 25, n. 2, p. 141-151. Feb. 2002.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 11, p. 1189-1202. Nov. 2004.

RIBEIRO, E. da S.; CENTENO, D. da C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J.; OLIVEIRA, A.E.A. Free Cyclitol , Soluble Carbohydrate and Protein Contents in *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* Bean Sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 8, p. 4273-4278. Mar. 2011.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 1, p. 11-29. Jan. 2001.

SANTISOPASRI, V.; KUROTJANAWONG, K.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K.; SRIROTH, K.; OATES, C. G. Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 2, p. 115-129. Mar. 2001.

SANTOS, T.B. dos; BUDZINSKI, I.G.F.; MARURA, C.J.; PETKOWICZ, C.L.O.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Maryland, v. 49, n. 4, p. 441-448. Apr. 2011.

SHAO, H-B.; CHU, L-Y.; JALEEL, C.A.; ZHAO, C-X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n.3, p. 215-225. Mar. 2008.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 33-37. Jan. 2002.

_____; POROYKO V.; HEJLEK, L.G.; SPOLLE, W.G.; SPRINGER, G.K.; BOHNERT, H.J.; NGUYEN H.T. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, p. 2343-2351. Nov. 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water stress response. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 327-334. Oct. 1997.

SILVA, E.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; NETO, A.D.A.; BRITO, J.Z.; CABRAL, E.L. Aspectos ecofisiológicos de dez espécies em uma área de caatinga no município de Cabaceiras, Paraíba, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 59, n. 2, p. 201-205. Jun-Dez. 2004.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 3, p. 1012-1018. Oct. 2007.

SINGH, T.N.; ASPINAL, D.; PALEG, L.G. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: potential metabolic measure of drought resistance. **Nature New Biology**, London, v. 236, 188–190. Apr. 1972.

SINGH-SANGWAN, N.; FAROOQI, A. H. A; SINGH- SANGWAN, R. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. **New Phytologist**, Lancaster, v.128, n. 1, p. 173-179. Sep. 1994.

SLAMA, I.; MESSEDI, D.; GHNAYA, T.; SAVOURE, A.; ABDELLEY, C. Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 231-238. July 2006.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q.J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, New York, v. 28, n. 4, p. 1057–1060. 1989.

SOMAL, T.L.C.; YAPA, P.A.J. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 11, p. 2465-2473, 1998.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 160, n. 1, p. 61-68. Sep. 1945.

SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic effect and antioxidant potencial of kaempferol-3, 7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, m. 5, p. 829-832. 2004.

SOUZA, S.C. de. **Análise das alterações metabólicas de *Canavalia ensiformis* durante germinação e desenvolvimento pós-germinativo em resposta a insulina e compostos relacionados**. 2010. 87p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2010.

SPOLEEN, W.G.; NELSON, C.J. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n.1, p. 329-336. Sep. 1994.

STEWART, G.R.; LEE, J.A. Role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, Berlin, v. 120, n. 3, p. 279–289. Jan. 1974.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 89-97. Feb. 2010.

SZIDERICS, A.H.; OUFIR, M.; TROGNITZ, F.; KOPECKY, D.; MATUSÍKOVÁ, I.; HAUSMAN, J-F.; WILHELM, E. Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 3, p.295-305. Mar. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do Estresse. In: TAIZ, L., ZEIGER, E. (Ed.), **Fisiologia Vegetal**. Artmed, 2009. p. 738-772.

TURNER N.C. Further progress in crop water relations. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 58, 293-338, 1997.

VALLIYODAN, B.; NGUYEN, H.T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Curent Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 189–195. Apr. 2006.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino acids**, Wien, v. 35, n. 4, p. 753-759. Nov. 2008.

VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amarantaceae) at different phonological phases. **Plant, Cell and Environmet**, Weinheim, v. 16, n. 8, 919-928. Nov. 1993.

WARREN, C.R.; ARANDA, I.; CANO, F.J. Responses to water stress of gas exchange and metabolites in *Eucalyptus* and *Acacia* spp. **Plant, Cell and Environment**, Weinheim, v. 34, n. 10, p. 1609-1629. Oct. 2011.

WHITTAKER, A.; MARTINELLI, T.; FARRANT, J.M.; BOCHICCHIO, A.; VAZZANA, C. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C₄ resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 13, 3775-3787. Oct. 2007.

XUE, X.; LIU, A.; HUA, X. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB Reports**, Seoul, v. 42, n. 1, p. 28-34, 2009.

YAMADA, N.; MORISHITA, H.; URANO, K.; SHIOZAKI, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIBA, Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p.1975-1981. July 2005.

ZEEMAN, S.C.; KOSSMANN, J.; SMITH, A.M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. **Annual Review of Plant Biology**, El Camino, v. 61, p. 209-234. Feb. 2010.

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

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St John's wort plants under a water stress condition. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 109-116. Mar. 2007.