



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA



GUSTAVO ANTONIO RUFFEIL ALVES

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE
PLANTAS JOVENS DE IPÊ-AMARELO (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) EM
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO**

**BELÉM
2010**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA



GUSTAVO ANTONIO RUFFEIL ALVES

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE
PLANTAS JOVENS DE IPÊ-AMARELO (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) EM
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Ciências Agrárias, área de concentração Agroecossistemas da Amazônia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Engenheiro Agrônomo Prof. Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho.

Co-orientador: Biólogo Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa.

**BELÉM
2010**

Alves, Gustavo Antonio Ruffeil

Aspectos ecofisiológicos, bioquímicos e crescimento de plantas jovens de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) em condições de déficit hídrico e alagamento. / Alves, Gustavo Antonio Ruffeil Alves. - Belém, 2010.

73 f.:il.

Tese (Doutorado em Ciências Agrárias/Agroecossistemas da Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia/Embrapa Amazônia Oriental, 2010.

1 *Tabebuia serratifolia* 2. Prolina 3. Déficit hídrico 4. Lactato desidrogenase I. Título.

CDD – 581.42



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA



GUSTAVO ANTONIO RUFFEIL ALVES

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE
PLANTAS JOVENS DE IPÊ-AMARELO (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) EM
CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Ciências Agrárias, área de concentração Agroecossistemas da Amazônia, para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 14 de Outubro de 2010

BANCA EXAMINADORA:

Engenheiro Agrônomo Prof. Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho - Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Engenheiro Agrônomo Prof Dr. Marco Antônio Menezes Neto -1º Examinador
Universidade Federal do Pará– UFPa

Biologo Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa - 2º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Engenheiro Agrônomo Prof Dr. Heráclito Eugênio Oliveira da Conceição - 3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

Farmacêutica Profª Drª Maria Auxiliadora Feio Gomes - 4º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

À DEUS, pelo dom da vida

À minha mãe, **SAPHYRA RUFFEIL ALVES**

À minha irmã, **MAIRA RUFFEIL ALVES**

Pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos de ausência
para a concretização deste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal Rural da Amazônia e ao seu corpo docente, por me proporcionar o aprendizado e o aprimoramento profissional.

A PETROBRAS através da REDE CTPETRO-AMAZÔNIA pelo apoio logístico e financeiro para a realização deste trabalho.

Ao amigo, Prof. Dr. Marco Aurélio Leite Nunes, da Universidade Federal Rural da Amazônia, pela orientação e pelos conhecimentos repassados, além de sua valiosa amizade e estímulo na vida acadêmica e pessoal.

Ao amigo, Prof. Dr. Wilson José Mello e Silva Maia, da Universidade Federal Rural da Amazônia, pela orientação e estímulo na vida acadêmica.

Ao orientador, Prof. Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho, da Universidade Federal Rural da Amazônia, pela orientação e estímulo no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa, da Universidade Federal Rural da Amazônia, pelo apoio, orientação e estímulo no presente trabalho.

Aos amigos e colegas Allan Lobato e Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pela sua confiança e amizade, pelas horas de trabalho junto, ligado a análises e as últimas grandes publicações internacionais.

Ao amigo Iridan Nascimento Silva, pelas horas despendidas e incansáveis na execução deste trabalho.

Agradecimentos especiais à minha mãe, Saphyra Ruffeil Alves e à minha irmã Maira Ruffeil Alves e minha esposa Tatiana Martins Viana da Silva pela incondicional ajuda e compreensão durante a execução deste trabalho.

E aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho de pesquisa.

“⁴ Por isso, ainda que ande no meio da sombra da morte,
Não temerei males, porque estás comigo.
Tua vara e teu báculo me consolaram.”

(Salmo 22)

SUMARIO

COMPORTAMENTO ECOFISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO E CRESCIMENTO DE IPÊ-AMARELO (<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nicholson) EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Descrição e importância do Ipê-amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>).....	14
2.2 Déficit Hídrico.....	15
2.3 Regulação da Resposta ao Déficit Hídrico.....	18
2.4 Alagamento.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Caracterização do Ambiente.....	24
3.2 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	24
3.3 Condução das Plantas.....	25
3.4 Variáveis Ambientais e Biofísicas.....	26
3.4.1 Variáveis Ambientais	26
3.4.2 Variáveis Biofísicas	26
3.5 Concentrações de Ácido Abscísico.....	26
3.5.1 Extração e Purificação	27
3.5.2 Separação por HPLC e Detecção por MS/MS	27
3.6 Determinação das Concentrações de Nitrato.....	28
3.7 Determinação da Atividade da Redutase do Nitrato.....	28
3.8 Determinação das Concentrações de Amônio Livre.....	29
3.9 Determinação da Atividade da Glutamina Sintetase.....	29
3.10 Determinação das Concentrações de Prolina.....	30
3.11 Determinação das Concentrações de Glicina-Betaina.....	31
3.12 Determinação das Concentrações de Aminoácidos Solúveis Totais.....	31
3.13 Determinação das Concentrações de Proteínas Solúveis Totais.....	32
3.14 Determinação das Concentrações de Amido.....	32
3.15 Determinação das Concentrações de Sacarose.....	33
3.16 Determinação da Concentração de Carboidratos solúveis Totais.....	33
3.17 Atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase.....	34
3.18 Determinação dos Teores de Clorofila a, b, total (a+b) e Carotenóides.....	34
3.19 Crescimento.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Potencial Hídrico da Folha, Transpiração, Condutância Estomática e Concentrações de Ácido bscísico (ABA).....	36
4.2 Concentrações de Nitrato e Atividade da Redutase do Nitrato.....	39
4.3 Concentrações de Amônio Livre e Atividade da Glutamina Sintetase (GS).....	41
4.4 Concentrações de Prolina, Glicina-Betaina, Aminoácidos Solúveis Totais e Proteínas Solúveis Totais.....	42
4.5 Concentrações de Amido, Sacarose e Carboidratos Solúveis Totais.....	47
4.6 Atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase.....	50
4.7 Teores de Pigmentos Fotossintéticos.....	52
4.8 Altura da Planta, Diâmetro do Caule, Número de Folhas e Área Foliar.....	54
4.9 Massa Seca da Parte Aérea, Massa Seca da Raiz, Razão Parte Aérea/Raiz e Massa Seca Total.....	57
4.10 Descrição Morfológica.....	60

5 CONCLUSÃO.....	64
REFERENCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Esquema da via metabólica da biossíntese de prolina a partir de glutamato em plantas; B) Compartimentos celulares envolvidos no processo. (Adaptado de VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).....	20
Figura 2. Potencial hídrico (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentrações de Ácido Abscísico (D) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	37
Figura 3. Concentrações de Nitrato (A) e Atividade da Redutase do Nitrato (B) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	40
Figura 4. Concentrações de Amônio Livre (A) e Atividade da Glutamina Sintetase (B) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	41
Figura 5. Concentrações de Prolina (A), Glicina-Betaína (B), Aminoácidos Solúveis Totais (C) e Proteínas Solúveis Totais (D) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	44
Figura 6. Concentrações de Amido (A), Sacarose (B) e Carboidratos Solúveis Totais (C) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	48
Figura 7. Atividade da Álcool Desidrogenase (A) e Lacato Desidrogenase (B) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	51
Figura 8. Teores de Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> , total e Carotenóides em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa,2009.....	53
Figura 9. Altura da Planta (A), Diâmetro do Caule (B), Número de folhas (C) e Área Foliar (D) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa,2009.....	55
Figura 10. Massa Seca da Parte Aérea (A), Massa Seca da Raiz (B), Razão Parte Aérea/Raiz (C) e Massa Seca Total (D) em plantas de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.....	58
Figura 11. Planta de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) com quatro dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009	60
Figura 12. Planta de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) com cinco dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009.....	61
Figura 13. Planta de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) com oito dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009.....	62
Figura 14. Planta de Ipê- amarelo (<i>Tabebuia serratifolia</i>) com nove dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos físico-químicos de um Latossolo Amarelo Textura Média no Estado do Pará. 2009.....	24
---	----

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E CRESCIMENTO DE PLANTAS JOVENS DE IPÊ-AMARELO (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) EM CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO E ALAGAMENTO

1 - RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos ecofisiológicos, bioquímicos e o crescimento de ipê-amarelo sob déficit hídrico e alagamento. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação localizada no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém, PA, Brasil. Foram utilizados vasos com capacidade de 30 L de substrato. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado sob três condições hídricas: controle, déficit hídrico e alagamento, com 15 repetições, totalizando 45 unidades experimentais, no qual cada unidade experimental foi composta por uma planta.vaso⁻¹. Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando ocorreu diferença significativa, às médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. O experimento foi realizado com mudas de sete meses de idade, após a germinação, e o período total de execução do experimento foi de nove dias, estabelecidos em ensaios preliminares. Os parâmetros avaliados foram potencial hídrico, transpiração, condutância estomática, ácido abscísico, concentração de nitrato, atividade da redutase do nitrato, amônio livre, atividade da glutamina sintetase, prolina, glicina betaína, aminoácidos livres, proteínas livres, amido, sacarose, carboidratos, álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, teores de clorofila *a*, *b*, totais e caroteno, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, razão parte aérea/raiz, massa seca total. Em relação às concentrações de Prolina nas folhas, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob déficit hídrico e sob alagamento apresentaram 2,60; 4,10 e 0,15 $\mu\text{mol Pro g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, nas raízes ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob déficit hídrico e sob alagamento apresentaram 1,9, 2,8 e 0,2 $\mu\text{mol Pro g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente. Na atividade da Lactato Desidrogenase ocorreu variação significativa entre os tratamentos, tanto nas raízes quanto nas folhas. Em relação as folhas foram observados os valores de 0,60, 0,25 e 1,1 moles de $\text{NADH H}^+ \text{Kg}^{-1}$ de proteína min^{-1} no controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente, nas raízes foram observados os valores de 0,5, 0,2 e 1,2 moles de $\text{NADH H}^+ \text{Kg}^{-1}$ de proteína min^{-1} obtidos nos tratamentos controle, sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente. O alagamento e o déficit hídrico promoveram mudanças em nível bioquímico, fisiológico e morfológico, no qual as plantas sob alagamento foram observados efeitos altamente prejudiciais, enquanto que na situação de déficit hídrico as alterações sobre o metabolismo do carbono e do nitrogênio estão relacionadas com o ajuste dos compostos osmolíticos. Portanto, as análises efetuadas revelaram que as plantas de Ipê-Amarelo são altamente sensíveis ao alagamento e tolerantes ao estresse hídrico.

Palavras-chaves: Prolina, alagamento, déficit hídrico, lactato desidrogenase, *Tabebuia serratifolia*

ECOPHYSIOLOGICAL ASPECTS, BIOCHEMICAL, AND GROWTH OF YOUNG PLANTS OF IN IPÊ-AMARELO (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) IN TERMS WATER DEFICIT AND FLOODING CONDITIONS

2 – ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the ecophysiological, biochemical and growth aspects of ipê-amarelo under water deficit and flooding. The experiment was conducted in greenhouse localized in Instituto de Ciências Agrárias (ICA) of the Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), in Belém city, PA, Brazil. We used pots with a capacity of 30L of substrate. The experimental design utilized was randomized entirely with three water conditions: control, water deficit, and flooding, composed by 15 replicates and totaling 45 experimental units, as well as each experimental unit was formed by 1 plant.pot⁻¹. The results were submitted to variance analysis and when occurred significant difference, the averages were compared by the Tukey test at the 5% significance level. The experiment was carried out with young plants presenting seven old months, after germination, and the execution total period of the experiment was of nine days. The parameters evaluated were water potential, transpiration, stomatal conductance, abscisic acid, nitrate concentration, nitrate reductase activity, free ammonium, glutamine synthetase activity, proline, glycine-betaine, free amino acids, free proteins, starch, sucrose, carbohydrates, alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase, tenors of chlorophyll *a*, *b*, total and carotenoid, plant height, stem diameter, leaf number, leaf area, shoot dry matter, root dry matter, ratio shoot/root, total dry matter. In relation the proline concentrations in leaf, occurred significant difference among treatments, being that control plants, under water deficit, and flooding presented 2.60; 4.10, and 0.15 $\mu\text{mol Pro g}^{-1} \text{DM}$, respectively. In addition, the proline in root also presented significant difference among treatments, with control, water deficit, and flooding presenting 1.9, 2.8, and 0.2 $\mu\text{mol Pro g}^{-1} \text{DM}$, respectively. In lactate dehydrogenase activity occurred significant variation among treatments in root and leaf. In relation the leaf were showed the values of 0.60, 0.25, and 1.1 moles of NADH H⁺ Kg⁻¹ of protein.min⁻¹ in control, water deficit and flooding, respectively. Additionally, the root was showed the proline values of 0.5, 0.2, and 1.2 moles of NADH H⁺ Kg⁻¹ of protein. min⁻¹ obtained in control, water deficit and flooding treatments, respectively. The flooding and water deficit promoted changes in biochemical, physiological and morphological levels, in which the plants under flooding were showed intense effects and strong damages, while that in situation of water deficit the modifications on carbon and nitrogen metabolisms are related with adjustment due to action of osmotic compounds. So, this study revealed Ipê-Amarelo plants are highly sensitive to flooding and tolerant to water deficit.

Key words: Proline, flooding, water deficit, lactate dehydrogenase, *Tabebuia serratifolia*

3 – INTRODUÇÃO

O Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson) ocorre no Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. No Brasil, estende-se da Amazônia, Nordeste, até São Paulo. É uma espécie característica das florestas pluviais densas, desde o nível do mar até altitudes de 1200m, ocorrendo também em florestas secundárias e campinas, prefere solos bem drenados (LORENZI, 2002.)

A silvicultura brasileira, até o presente momento, teve sua atividade voltada principalmente para a produção de matéria-prima para as indústrias vinculadas à transformação de madeira e fibras, tendo as plantações restritas às espécies exóticas, por terem atendido melhor às necessidades industriais em produtividade. Porém, é sabido que algumas espécies nativas que ocorrem no Brasil são potencialmente aptas para plantações, podendo concorrer para a diversificação de oferta de matéria-prima para fins mais nobres, como serraria, laminação, indústria moveleira, dentre outras (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

O ipê-amarelo é uma espécie florestal nativa de importância relevante em função de suas utilidades econômicas, ornamentais e ecológicas. Árvore caducifólia apresenta o período da queda das folhas coincidindo com a floração de cor amarela vistosa, durante os meses de novembro e dezembro, na região Nordeste do Brasil, dando um belíssimo efeito paisagístico (BIONDI & REISSMANN, 2002).

O ipê-amarelo, *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich., trata-se de uma árvore que pode atingir 25 m de altura, tronco reto e cilíndrico, de 60-80 cm de diâmetro, frutos deiscentes com sementes aladas, ocorrendo anos de baixa ou nenhuma produção de sementes. O curto período de viabilidade das sementes e sua floração anual são também fatores que limitam a manutenção de um banco de sementes, o que, conseqüentemente, limita os estudos sobre essa espécie. É sabido, entretanto, que além dos fatores já mencionados, existem outros que, em muitos locais, inibem a germinação imediata, tais como: denso tapete gramináceo, pisoteio do gado e queimas periódicas, falta de sincronia entre a época de produção de sementes e a estação chuvosa (SOUZA, *et al.*, 2005).

O crescimento e a distribuição das plantas nos ecossistemas são controlados principalmente pela falta ou excesso de água. O estabelecimento e desenvolvimento das mesmas podem ser afetados pela inundação, a qual é ocasionada por diversos fatores tais como enchentes, tempestades, drenagem deficiente, etc. (HADDAD *et al.*, 2000). Em plantas sensíveis, a inundação reduz o crescimento e a sobrevivência. Por outro lado, plantas tolerantes suportam temporariamente as condições de anóxia por até poucos dias e o período

de sobrevivência sob alagamento é variável entre espécies florestais (BAILEY-SERRES & VOESENEK, 2008).

O ipê-amarelo é uma espécie muito utilizada na recuperação de áreas desmatadas, principalmente em áreas degradadas pela exploração petrolífera na Amazônia. Entretanto, vários problemas têm ocorrido na sua utilização, principalmente morte de espécimes no período chuvoso, devido a compactação dos solos ocasionando a inundação dos mesmos. Contudo pouco ou quase nada se sabe sobre seu comportamento ecofisiológico sob condições de déficit hídrico e alagamento. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos ecofisiológicos, bioquímicos e de crescimento de ipê-amarelo sob condições de déficit hídrico e alagamento.

4 - REVISÃO DE LITERATURA

4.1 – Descrição e importância do Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*)

A *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson (Bignoniaceae), conhecida popularmente como ipê-amarelo é uma espécie arbórea que atinge de 5-25m de altura. O tronco cilíndrico reto pode medir 60-80 cm de diâmetro e a copa 3-8m de diâmetro. A casca, de 10-15 mm de espessura, é pardo-acinzentada, fissurada e desprende-se em pequenas placas. As folhas são opostas, digitadas e 5-folioladas. Os folíolos são oblongos, ovais a lanceolados, com ápice acuminado e base arredondada a acuneada; apresentam consistência membranácea a subcoriácea; superfície glabra em ambas as faces ou com pêlos nas axilas das nervuras secundárias da face inferior; a margem é serreada, crenado-serreada ou raramente inteira. As flores hermafroditas são livres ou em tríades curtamente pedunculadas, dispostas em conjuntos umbeliformes nas pontas dos ramos. O cálice e a corola apresentam estrutura tubular com cinco lóbulos. O cálice de coloração esverdeada é ligeiramente pubescente. A corola amarelodourada mede 6-8cm de comprimento. O fruto é uma vagem septicida, coriácea, glabra, linear, de 20-65 cm de comprimento e 2,5-3,5cm de espessura. As sementes numerosas são retangulares, laminares, leves, com duas asas hialinas e curtas, pertencente a família Bignoniaceae (FERREIRA *et al*, 2004).

É uma árvore do tipo caducifólia, sua folhagem é renovada anualmente; as folhas caem no inverno e aparecem logo após a floração, que ocorre de julho a outubro (LORENZI, 2002). Ocorre no Brasil, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia. No Brasil, estende-se da Amazônia e Nordeste até São Paulo. É uma espécie

característica das florestas pluviais densas, desde o nível do mar até altitudes de 1200m, ocorrendo também em florestas secundárias e campinas (FERREIRA *et al.*, 2004).

O ipê-amarelo possui interesse econômico madeireiro, ornamental e medicinal. A madeira é empregada em marcenaria, construções pesadas e estruturas externas, tanto civis quanto navais. A árvore é utilizada em paisagismo e arborização urbana por causa de suas atrativas flores amarela (FERREIRA *et al.*, 2004). O seu princípio ativo é o lapachol, uma naftoquinona que está presente tanto nas cascas do caule como na serragem da madeira (MATOS, 2000). Várias espécies do gênero *Tabebuia* contêm na casca e no cerne do caule quantidades variáveis do lapachol e outras substâncias similares, dotadas de forte atividade bactericida (PARK *et al.*, 2005), fungicida (PORTILLO *et al.*, 2001), antiofídica (NÚÑEZ *et al.*, 2004) e antitumoral (CHENNA *et al.*, 2001).

Segundo Schneider *et al.* (2000), tem-se dado atenção ao plantio de espécies folhosas nativas, existindo poucas informações sobre ecologia e processo silvicultural dessas espécies na formação de povoamentos.

A frutificação do Ipê-Amarelo inicia-se no final do mês de janeiro, prolongando-se até meados de fevereiro, quando os frutos amadurecem e se abrem, liberando grande quantidade de sementes aladas que apresentam pequeno período de viabilidade (REITZ *et al.*, 1988).

Como as sementes de ipê-amarelo não suportam maiores períodos de armazenamento, é aconselhável efetuar a semeadura logo após a colheita, no entanto, devido às altas temperaturas e frequentes estiagens no período de dispersão é necessário armazená-las para posterior semeadura no início da estação chuvosa (PAIVA & GOMES, 2000).

4.2 – Déficit Hídrico

A seca é um estresse multidimensional que afeta as plantas em diversos níveis de organização, sendo definida basicamente como uma circunstância na qual as plantas sofrem redução no seu crescimento e produtividade devido à insuficiência de suprimento de água no solo ou a um grande déficit de umidade do ar (PASSIOURA, 1997). A baixa disponibilidade hídrica é atualmente o principal fator ambiental que limita o crescimento e a produtividade de plantas em todo o mundo, e as mudanças climáticas globais provavelmente contribuirão para que a falta de água se torne um fator de restrição ainda maior da produção em diversas áreas (CHAVES *et al.*, 2003).

Os efeitos do déficit hídrico variam em função de diversos fatores, como a intensidade do estresse, velocidade de imposição e estágio de desenvolvimento em que a planta se

encontra (KRAMER & BOYER, 1995). A redução da disponibilidade hídrica pode ser determinada pela queda no potencial de água (Ψ_w) (KRAMER & BOYER, 1995), parâmetro que na maioria dos casos é o primeiro sinal percebido e evitado pela planta. O conteúdo de água nos tecidos é mantido em condições não-estressantes de forma que as taxas de perda e captação de água estejam em equilíbrio, o qual é sustentado, em princípio, devido ao movimento estomático. Modificações no desenvolvimento que aumentam a razão raiz/parte aérea, a capacidade de acumular água nos tecidos, o espessamento da cutícula e sua permeabilidade também são fatores de grande importância na manutenção do equilíbrio do teor de água em tecidos vegetais (VERSLUES *et al.*, 2006).

Durante estágios iniciais do estresse, um pequeno dessecação do solo é suficiente para induzir o aumento da concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema (HARTUNG *et al.*, 2002). Também ocorre alteração da condutividade hidráulica da raiz e do xilema (JAVOT & MAUREL, 2002) que, ao transportar o ABA acumulado, pode levar ao fechamento dos estômatos nas horas mais quentes do dia (TARDIEU & SIMONNEAU, 1998) e redução no crescimento das folhas, enquanto o crescimento das raízes é mantido (HSIAO & XU, 2000). A manutenção da expansão radicular e a diminuição na condutância estomática melhoram o desempenho de espécies cultivadas durante a seca, entretanto, nesses casos ocorre queda nas taxas fotossintéticas devido à menor captação de CO₂ pelos estômatos, e o crescimento das raízes requer energia que é desviada de tecidos fotossintéticos e reprodutivos. Além disso, com o prolongamento do estresse esses mecanismos utilizados para evitar a perda de água não oferecem mais proteção contra os efeitos do baixo potencial hídrico (VERSLUES *et al.*, 2006).

Com a diminuição da transpiração em casos de déficit hídrico severo, a planta perde a habilidade de manter o equilíbrio entre a captação e perda de água, já que os níveis de água tanto no solo quanto nas células são baixos. Como mecanismo de tolerância, as plantas devem evitar a dessecação celular, seja impedindo o efluxo ou promovendo o influxo de água. O primeiro caso ocorre devido ao espessamento da parede celular e o segundo é resultado do acúmulo de solutos na célula, que reduz o potencial osmótico (Ψ_s), em um processo denominado ajustamento osmótico (ZHANG *et al.*, 1999).

Esses solutos são denominados solutos compatíveis, osmólitos compatíveis ou osmoprotetores e podem ser acumulados em grandes quantidades, não interferindo no metabolismo celular, além de apresentarem outras funções protetoras (YANCEY *et al.*, 1982). Aminoácidos como a prolina, compostos quaternários e outras aminas como glicinabetaína e

poliaminas, e uma variedade de açúcares e álcoois de açúcar como manitol, trealose, galactinol e rafinose, estão entre os principais solutos compatíveis acumulados durante o estresse (MAHAJAN & TUTEJA, 2005).

A limitação no desenvolvimento das plantas imposta pelo estresse ocorre principalmente devido à quebra no balanço de carbono, que é dependente das taxas de fotossíntese e respiração. Mais da metade do total de CO_2 assimilado é consumido no processo respiratório para manutenção e crescimento, porém, esse equilíbrio é perdido durante a falta de água (FLEXAS *et al.*, 2006). Atualmente existe consenso entre autores de que o fator que leva à queda da fotossíntese nesse caso é a reduzida difusão do CO_2 atmosférico ao sítio de carboxilação (CHAVES & OLIVEIRA, 2004), seja devido à resistência estomática ou menor condutância no mesófilo (WARREN *et al.*, 2004). Além disso, baixos potenciais hídricos impedem processos fotossintéticos devido a prejuízos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (LARCHER, 2000).

Ainda, quando plantas desidratadas são expostas a outros tipos de estresse como altas temperaturas ou luminosidade, pode ocorrer fotoinibição, que é a redução no potencial fotossintético quando a atividade dos fotossistemas é máxima, produzindo poder redutor (NADPH) e energia química (ATP) que não são consumidos pelo ciclo de Calvin, devido à baixa disponibilidade de CO_2 (LUDLOW & POWLES, 1988). Como não ocorre a transferência dos elétrons provenientes da fotólise da água, estes levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidam inicialmente compostos dos fotossistemas (PS), como centros de reação do PS II e proteína D1, e também diversas moléculas biológicas (MAXWELL & JOHNSON, 2000). O principal mecanismo de dissipação de energia nesses casos envolve o ciclo das xantofilas, que atua como uma importante estratégia na tolerância ao estresse (DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1996).

Diversos parâmetros fisiológicos envolvidos na resposta ao déficit hídrico são passíveis de quantificação. Esse monitoramento promove uma definição precisa das condições do sistema solo-planta-atmosfera e é pré-requisito para possibilitar a reprodução e interpretação de experimentos. O estado da água nos substratos e em tecidos vegetais pode ser determinado diretamente a partir de medições do conteúdo hídrico, ou por medidas baseadas no estado de energia da água nesses sistemas (JONES, 2007).

Diversas abordagens e ferramentas podem ser utilizadas para medidas do conteúdo de água nos substratos. Uma medida básica, que pode ser usada para calibração de outros métodos, é avaliar diretamente a umidade no solo por medidas gravimétricas, através da

diferença entre o peso dos solos em capacidade de campo e após a restrição de água (KIRKHAM, 2004).

Além dos métodos para medição direta das relações hídricas, estudos utilizam indicadores indiretos do estado da água baseados em análises do crescimento de plantas ou em respostas fisiológicas conhecidas por serem indicativas de déficits hídricos (JONES, 2007). As análises de crescimento incluem avaliações de mudanças morfométricas em ramos, folhas e frutos, assim como redução da expansão celular e de taxas de crescimento (FERERES & GOLDHAMER, 2003). Já os parâmetros fisiológicos envolvem respostas como o fechamento estomático e redução de taxas fotossintéticas (JONES, 2007).

As taxas de transpiração aumentam linearmente com o aumento da condutância estomática, e podem ser expressas em $\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A perda de água para a atmosfera também pode ser estimada através da quantificação do movimento hídrico nas plantas, pela determinação do fluxo de seiva do xilema. Essas medidas têm sido realizadas com base em metodologias de fornecimento de calor no caule e são utilizadas por vários autores, que adotaram este método tanto em plantas herbáceas (HEILMAN & HAN, 1990), como em plantas lenhosas (MARIN, 2000). Em citros, o fluxo de seiva xilemática pode atingir valores de $150 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, no momento em que há maior demanda evaporativa da atmosfera, e esses valores podem decair a mais da metade em situações estressantes.

4.3 – Regulação da Resposta ao Déficit Hídrico

O estresse em plantas causa mudanças em suas condições de crescimento que alteram ou prejudicam a homeostase no metabolismo. Tais mudanças requerem um ajuste das vias metabólicas, visando adquirir um novo estado de homeostase, em um processo denominado aclimatação ou tolerância (MITTLER, 2006).

De uma forma geral, o processo de aclimatação envolve uma série de mecanismos complexos que se iniciam com a percepção da planta ao estresse, a partir da qual ocorre ativação de vias de transdução de sinais que desencadeiam a síntese de proteínas e outros compostos (SHULAEV *et al.*, 2008). Essas proteínas e compostos induzem respostas bioquímicas e fisiológicas que envolvem o fechamento estomático, redução no crescimento celular e na fotossíntese e ativação da respiração (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2007).

O déficit hídrico induz a síntese do fitormônio ácido abscísico (ABA), responsável pelo fechamento dos estômatos e ativação de genes relacionados à seca. Entretanto, alguns genes

envolvidos na resposta ao estresse parecem não responder ao ABA, o que indica a existência de vias ABA-dependentes e ABA-independentes de ativação de genes induzidos por estresses ambientais (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). Muitos desses genes foram identificados por análises de *microarrays* em *Arabidopsis*, e seus produtos podem ser classificados em dois grupos. No primeiro encontram-se as proteínas que parecem atuar diretamente na tolerância a estresses abióticos, como chaperonas, proteínas LEA (*Late Abundant Proteins*), osmotinas, proteínas anti-congelamento e de ligação a mRNA, enzimas para biossíntese de osmólitos, aquaporinas, transportadores iônicos, de açúcares e de aminoácidos, enzimas detoxificadoras e proteases (BRAY *et al.*, 2000). O segundo grupo contém fatores envolvidos na regulação ou transdução de sinais durante a resposta ao estresse, sendo denominadas proteínas regulatórias. Estas incluem os fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases, enzimas do metabolismo de fosfolípidos e outras moléculas sinalizadoras como proteínas de ligação à calmodulina (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2007).

O acúmulo de prolina em plantas ocorre em resposta a estresses ambientais como alta salinidade, déficit hídrico, temperaturas extremas, metais pesados, presença de patógenos, anaerobiose, deficiência nutricional, poluição atmosférica e radiação UV (SIRIPORNADULSIL *et al.*, 2002). A presença do estresse induz a síntese de prolina e inibe a sua degradação, sendo que a concentração do aminoácido nessas condições varia entre as espécies vegetais e depende do nível do estresse ao qual foram expostas (DELAUNEY & VERMA, 1993), podendo acumular 100 vezes mais do que em condições normais (VERBRUGGEN & HERMANS, 2008).

Sabe-se que a prolina desempenha um importante papel adaptativo na tolerância das plantas ao estresse, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora. Durante situações de seca e alta salinidade, o seu acúmulo resulta em aumento na osmolaridade da célula, que leva ao influxo de água ou redução no efluxo e promove a manutenção do turgor necessária para a expansão celular (KAVI KISHOR *et al.*, 2005).

A prolina parece interagir com enzimas e outras proteínas preservando suas estruturas e atividades, além de atuar como mediador do ajustamento osmótico e estabilizador de estruturas protéicas (VAN RENSBURG *et al.*, 1993). Em plantas superiores, a prolina é sintetizada via ácido glutâmico (glutamato) ou ornitina. A primeira ocorre no citoplasma e em cloroplastos, e é considerada a principal via, especialmente sob estresse osmótico (KAVI KISHOR *et al.*, 1995).

4.4 – Alagamento

O estresse causado pela saturação hídrica do solo elimina os espaços anteriormente ocupados pelo ar, limitando as trocas gasosas com a atmosfera. Em poucas horas as raízes e microrganismos consomem o O₂ dissolvido na água, criando um ambiente no solo hipóxico ou anóxico. O solo tornando-se hipóxico ou anóxico leva as raízes a uma situação de estresse fazendo com que as plantas respondam com maior ou menor eficiência, permitindo a distinção entre espécies tolerantes e intolerantes à baixa disponibilidade de O₂ (ARMSTRONG *et al.*, 1994).

Kozlowski e Palardy (1995) sugerem que a inundação desencadeia uma série de processos que influenciam as características físico-químicas e biológicas do solo, sendo um dos fatores que pode levar a uma rápida redução da atividade fotossintética.

O grau de injúria e a capacidade de sobrevivência das plantas à inundação são influenciados pela altura da lâmina de água, a concentração de O₂, de CO₂ e de etileno dissolvidos na água, do pH e da turbidez (ITO *et al.*, 1999). Esses fatores afetam processos metabólicos primordiais a sobrevivência dos vegetais, como as trocas gasosas foliares, as relações hídricas, absorção de macro e micro nutrientes, a partição e translocação de fotoassimilados, a produção de biomassa, entre outros (PEZESHKI, 2001).

Em um solo com drenagem deficiente, quando ocorre inundação, os espaços porosos são preenchidos pela água. Para as plantas, o principal efeito imposto pela inundação é o impedimento das trocas gasosas entre o sistema radicular e o espaço poroso do solo, visto que a resistência de difusão de muitos gases é aproximadamente 1000 vezes maior na água que no ar (ARMSTRONG *et al.*, 1994). No caso do O₂, a velocidade de difusão na água é 100 vezes menor que no ar (THOMSON & GREENWAY, 1991) e sua concentração no ar é 30 vezes maior que dissolvido na água, fazendo com que menos de 1 mm e não mais do que poucos centímetros da superfície de um solo inundado apresentem condições aeróbicas (ARMSTRONG *et al.*, 1994). Entretanto, após 24 h de inundação, com temperatura ambiente superior a 20 °C, pode haver esgotamento total do O₂ do solo devido ao consumo por microrganismos, fauna e raízes (DREW *et al.*, 2000), ocasionando o acúmulo de gás carbônico, metano, etileno e gás sulfídrico (LIESACK *et al.*, 2000).

Quando a respiração aeróbica cessa nas raízes, imediatamente ocorre uma queda nos níveis de energia (ATP) e, como consequência, há uma redução na absorção e transporte de íons que demandam a atividade de ATPases, podendo ocasionar uma redução nas trocas gasosas entre a planta e o ambiente (LIAO e LIN, 2001). Entretanto, é necessário salientar

que em se tratando de nutrição mineral, as respostas fisiológicas de plantas tolerantes diferem das não tolerantes ao alagamento (KOZLOWSKI, 1995).

A diminuição da condutância estomática (g_s) é uma das primeiras respostas ao estresse ambiental, contudo se esta condição continuar por um longo período os mecanismos envolvidos são mais complicados que simplesmente a redução de g_s , implicando em limitações bioquímicas da taxa de fotossíntese (JALEEL, *et. al.*, 2009).

O encharcamento do solo assim como a submersão total da planta afeta a fase fotoquímica nas folhas, com isso há uma diminuição das reações a nível cloroplastídico e, conseqüentemente uma redução no fornecimento de energia gerada pelo fotossistema II afetando os processos fotossintéticos subseqüentes, como resultado imediato há uma redução no crescimento que pode ser irreversível após a drenagem da água (KRAMER & BOYER, 1995).

Há hipoxia quando a pressão parcial de O_2 limita a produção de ATP pela mitocôndria (DREW, 1997), sendo o metabolismo hipóxico caracterizado pela atividade simultânea da respiração limitada (metabolismo aeróbico) e algum grau de fermentação (metabolismo anaeróbico). A anoxia ocorre quando a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é desprezível em relação ao gerado pela glicólise e fermentação (DREW, 1997).

A síntese de etileno pelos tecidos é fortemente promovida pela hipoxia, mas bloqueada pela anoxia, devido ao requerimento de O_2 livre para a conversão de ACC (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico) para etileno, pela ACC oxidase (PENG *et al.*, 2001). No sistema radicular inundado, durante a diminuição da disponibilidade de O_2 , a respiração aeróbica é substituída parcialmente pela glicólise e fermentação. Neste caso, a respiração mitocondrial é limitada pela falta de O_2 como acceptor final de elétrons. A fermentação corresponde a um período excepcional e transitório no metabolismo das raízes, onde a produção de ATP cai de 36 para 2 moles por mol de glicose metabolizada (SOUSA & SODEK, 2002).

Na respiração anaeróbica, pela falta de O_2 como acceptor final de elétrons, ocorre o acúmulo de intermediários no ciclo de Krebs, diminuição da disponibilidade de NAD^+ e acúmulo de piruvato. A partir do piruvato são produzidos os principais produtos da fermentação em tecidos vegetais: etanol, lactato e alanina. Embora a atividade conjunta da glicólise e fermentação permitam apenas a síntese limitada de ATP, pela fosforilação ao nível de substrato, regenera-se NAD^+ e remove-se o excesso de prótons (MORARD & SILVESTRE, 1996). A injúria e morte das raízes têm sido atribuídas ao acúmulo de

metabólitos tóxicos produzidos durante a fermentação (principalmente etanol), diminuição no metabolismo energético e a falta de substratos para a respiração (DREW, 1997).

A regulação do pH citosólico é considerada o fator determinante da sobrevivência do tecido vegetal à deficiência de O₂. A acidificação do citosol tem sido atribuída ao ácido láctico. Entretanto, estudos cinéticos envolvendo mudanças na concentração de lactato, pH citosólico e nucleotídeos, depois da transferência para anoxia e com posterior reoxigenação, demonstram que o pH citosólico muda muito mais rapidamente que a concentração de lactato e a mudança está relacionada com o decréscimo de ATP. Isto sugere que o decréscimo de ATP é a principal causa da acidificação do citosol, que pode ocorrer pela inibição da bomba de prótons, devido à baixa concentração de ATP e pela liberação de H⁺ no citosol via hidrólise de ATP (RICARD *et al.*, 1994).

As reservas de amido nas raízes são consideradas de fácil mobilização durante a inundação do solo e podem rapidamente prover os açúcares para o metabolismo anaeróbico (PERATA *et al.*, 1992). A quantidade de amido nas raízes diminui marcadamente nos primeiros dias de inundação, aumentando os teores de glicose e frutose (LIAO & LIN, 2001). Entretanto, o transporte de fotoassimilados às raízes diminui devido à redução da demanda de carboidratos destas ou pelo colapso do sistema de transporte de fotoassimilados, diminuindo a taxa fotossintética das folhas, que mesmo assim, acumulam amido (HSU *et al.*, 1999).

O excesso de água no solo causa a redução imediata na troca de gases entre a planta e o ambiente (LIAO & LIN, 2001). A anoxia ou a hipoxia sofrida pelo sistema radicular altera o metabolismo celular, provocando queda imediata na respiração das raízes, tanto em plantas tolerantes como nas intolerantes (LIAO & LIN, 2001). A deficiência de oxigênio reduz a produção de ATP, afetando diversos aspectos do metabolismo celular (FUKAO & BAILEY-SERRES, 2004). Essa queda na produção de ATP restringe o suprimento de energia para o crescimento das raízes, reduzindo o desenvolvimento geral da planta.

Respostas da parte aérea ao estresse imposto às raízes pelo alagamento podem ser mediadas por mudanças no fluxo de substâncias entre os dois sistemas (JACKSON 1985). Dentre estas mudanças, é importante ressaltar o acúmulo de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) nas raízes sob alagamento e seu transporte para a parte aérea, onde é convertido a etileno (BRAILSFORD, *et. al*, 1993).

5- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA), da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), em Belém-PA, Brasil (01°27'S e 48°26'W) no período de 20/01/2009 a 20/05/2009. O substrato utilizado para o crescimento das mudas foi uma mistura de 3:1:1 sendo: três partes de terra preta (constituída do solo latossolo amarelo, textura média, previamente seco ao ar e retiradas as impurezas através dos processos de peneiramento e catação), uma parte de esterco de galinha e uma parte de húmus de minhoca. Foram realizados testes preliminares para verificar a capacidade de campo do substrato, calagem para a correção do pH do solo e suplementação de macro e micronutrientes com base na análises físico-químicas do solo (tabela 1), aplicando-se 600 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), dividida em doses de 200 mL por mês, durante o experimento.

Tabela 1. Atributos físico-químicos de um Latossolo Amarelo textura média, no Estado do Pará. 2009

Atributos Físico-Químicos															
		Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila Total	Argila Natural									
g/Kg															
		345	357	163	116	20									
pH	pH	N	MO	P	K	Na	Ca	Ca + Mg	Al	H ⁺ / Al	Cu	Mn	Fe	Zn	
KCl	%	g/Kg	g/Kg		mg/dm ³			cmolC/dm ³			mg/Kg				
4,9	4,3	0,2	12,6	2	22	11	0,6	0,9	0,9	6,51	0,8	10	172,1	1,4	

5.1- Caracterização do Ambiente

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, que apresentou, durante o período de avaliações, temperatura do ar (Tar) mínima de 24,5 °C, máxima de 39 °C e média de 31,75°C, Umidade Relativa do Ar (UR) variando entre 53,3% a 91% com média de 72,15%. Determinou-se, também, a Temperatura da Folha (Tfol) que em média foi de 30,3°C e a Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) que variou de 42 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 968 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ (as 13h00). Com as médias da Tar, Tfol e UR, foi calculado o Déficit de Pressão de Vapor D'água entre a folha e a atmosfera (DPV_{FA}) que variou de 0,38 kPa a 1,89 kPa.

5.2- Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três condições hídricas: controle, déficit hídrico e alagamento, com 15 repetições, totalizando 45 unidades experimentais, compostas de uma (1) planta/vaso. Foi aplicada a análise de variância nos resultados e quando ocorreu diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Além disso, foi calculado o desvio-padrão das médias de cada tratamento, sendo as análises estatísticas realizadas usando-se o programa SAS-Institute (1996) e embasadas nas teorias estatísticas preconizadas por Gomes & Garcia (2000).

5.3- Condução das Plantas

Foram realizados experimentos preliminares para determinar o período em que as plantas que foram submetidas ao déficit hídrico e alagamento permaneciam vivas em uma das situações. Foi observado que 10 dias de alagamento causou a morte das plantas. Assim, a duração do período de estresse foi de nove dias com três regimes hídricos: plantas irrigadas normalmente (controle), plantas sob déficit hídrico (suspensão da irrigação) e plantas sob alagamento (manutenção de lâmina d'água de cerca de 5 cm acima do nível do solo).

Durante o período experimental as plantas controles foram irrigadas diariamente para repor a água perdida pelo fenômeno da evapotranspiração, sendo feita individualmente para cada vaso, levando em consideração as pesagens diárias do conjunto (vaso + planta + solo) e também do controle da vegetação espontânea a partir da capina manual, sem ocorrência de deficiência nutricional, pragas e patógenos. Os furos dos vasos do tratamento alagado foram vedados para evitar a drenagem da água.

Foram utilizadas mudas de Ipê- Amarelo com 7 meses de idade, provenientes de sementes coletadas na Província Petrolífera do Rio Urucu, Base Operações Geólogo Pedro de Moura- "URUCU", município de Coari-AM. As sementes foram coletadas em Junho de 2008 em 19 áreas: RUC 06; RUC 10; RUC 31; RUC 25; JAZ 97; JAZ 06; JAZ 21; JAZ 16; CL 10; CL 33; CL 11; CL 05; CL 04; SUC 03; SUC 02; SUC 01; LUC 29; LUC 39; LUC 40. Após a coleta, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e transportadas para o laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRA, Belém-PA, onde foram transferidas para vasos contendo substrato corrigido a acidez e estado nutricional (adubação de macro e micronutrientes), conforme análise do solo (Tabela 1). Antes de serem submetidas aos tratamentos, as plantas de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson, passaram por um período de aclimação de sete meses. Dessa forma, as plantas estavam com sete meses de idade no início dos tratamentos.

Os vasos utilizados tinham 0,30 m de altura por 0,30 m de diâmetro, com capacidade para 30 L de substrato. Cada vaso foi completamente cheio com substrato, sobre uma camada de 0,02 m de pedra britada para facilitar a drenagem do solo.

5.4- Variáveis Ambientais e Biofísicas

5.4.1 – Variáveis Ambientais

As variáveis ambientais como a temperatura e a umidade relativa do ar, foram determinadas ao longo das medições de trocas gasosas, utilizando-se um termo-higrômetro (mod. 5203, Incoterm, RS, Brasil); e o déficit de pressão de vapor d'água entre a folha e atmosfera (DPV_{FA}) foi estimado matematicamente, segundo Lambers *et al.* (1998), levando-se em conta a temperatura do ar (T_{ar}), umidade relativa do ar (UR) e a temperatura da folha (T_{fol}).

5.4.2 – Variáveis Biofísicas

A temperatura da folha, a transpiração e a condutância estomática foram determinadas por meio de um porômetro portátil de equilíbrio dinâmico (mod. Li 1600, Licor, Nebraska, USA), sob luz e CO_2 ambientais. A Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) foi determinada utilizando-se um sensor quântico acoplado ao porômetro.

As medições foram realizadas nas folhas definitivas e totalmente expandidas e, sempre, no horário das 10:00 h, coincidindo com a retirada das amostras para as análises bioquímicas.

O potencial hídrico da folha (ψ_f) foi determinado entre 9:00 e 10:00 h, utilizando-se uma Bomba de Pressão de Scholander (mod. PMS Instrument Co, Corvallis, USA), conforme descrito por Da Matta *et al.*, (1993).

5.5- Concentrações de Ácido Abscísico

As amostras de folhas e raízes foram coletadas no mesmo horário em que foram realizadas as análises de trocas gasosas. Foram coletados cinco discos foliares, de 1,25cm de diâmetro, de folhas completamente expandidas do terceiro ou quarto par a partir do ápice e cinco gramas de raízes foram coletadas aleatoriamente no sistema radicular de plantas controles e estressadas. Após a coleta, as amostras de folhas e raízes foram imediatamente congeladas em N líquido e posteriormente secas em estufa.

5.5.1- Extração e Purificação

Foi utilizado o protocolo descrito por Ross *et al.* (1995), com algumas modificações. Os tecidos de folhas e raízes secas em estufa de circulação de ar forçado foram macerados em N líquido com 100% de Polivinil Polipirrolidona (PVPP). Foram utilizados 50 mg de massa seca de folhas e 200 mg de massa seca de raiz. Em seguida, foi colocado o solvente de extração (acetona/H₂O/ácido acético: 80/19/1). Para folhas utilizou-se 1,5 mL e para raiz 2,5 mL do solvente de extração. O extrato foi transferido para outro tubo. O almofariz foi lavado com mais 500 µL do solvente de extração (acetona/H₂O/ácido acético: 80/19/1) e transferido para o mesmo tubo, adicionando-se 40 mg de (-)-5,8',8',8'-d₄-ABA deuterado. As amostras foram então agitadas por 40 min a 4°C e centrifugadas (15.000 x g/10 min/4°C). O sobrenadante foi coletado e transferido para outro frasco e o resíduo lavado com mais 250 µL do solvente de extração e centrifugado (15.000 x g /10 min/4°C), o sobrenadante foi novamente coletado e adicionado ao primeiro sobrenadante. Os sobrenadantes combinados foram liofilizados e dissolvidos em 100 µL de metanol/ácido acético (99/1) mais 900 µL de H₂O /ácido acético (99/1) e, em seguida, centrifugado (15.000 x g /2 min/4°C). O sobrenadante foi transferido para coluna de extração de fase sólida (SPE) (Oasis HLB 1, Waters, Mil Ford, MA, USA) e o ABA foi diluído com 1 mL de metanol/H₂O/ácido acético (80/19/1). O extrato foi liofilizado e o concentrado foi ressuscitado em 220 µL de (85/15) (H₂O/acetonitrila com 0,07% de ácido acético), agitado em baixa velocidade por 5 min (4°C), sonificado por 5 min e centrifugado (15.000 x g/10 min/4°C). O sobrenadante foi, em seguida, transferido para via injetora.

5.5.2- Separação por HPLC e Detecção por MS/MS

As separações cromatográficas das amostras de folhas e raízes foram feitas em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Micromass, modelo Quattro II com fonte Z-sprayTM, Manchester, Reino Unido). O HPLC possuía duas bombas LC-ADvp, um detector UV/VIS SPD-10ADvp, um auto-injetor SIL-10ADvp e um controlador de sistema SCL-10Avp.

As análises foram feitas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa no modo de ionização *electrospray* negativo (HPLC/MS/ESI-). As amostras foram analisadas, utilizando-se de uma coluna cromatográfica C-18 Supelcosil (Supelco; 15 cm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, cinco mm de tamanho da partícula), com fluxo de 0,3 mL min⁻¹

¹. Os eluentes usados foram ácido fórmico 0,1% (A) e acetona (B). O gradiente linear utilizado foi de 15% até 100% de B em 20 min, 100% de B por mais 5 min, 100% a 15% de B em 2 min e 15% até 30 min. O comprimento de onda selecionado foi de 252 nm. As condições de ionização foram: voltagem do capilar de 4kV, temperatura da fonte de 100°C e temperatura de dessolvatação de 200°C, voltagem do cone de amostragem e extrator de 30 V e 5 V, respectivamente, energia de colisão de 15 eV, fluxo de gás de secagem -400 L h⁻¹, fluxo de gás de dessolvatação de 15 L.h⁻¹ e argônio como gás de colisão. Os dados foram processados pelo software MassLynx NT (versão 3,2, Micromass, Altricham, Reino Unido). A detecção e quantificação de ABA nas amostras foram feitas mediante o monitoramento de reações múltiplas (MRM) via seleção de transição de massa específica da molécula de interesse (para o ABA, 263 → 153 e, para o ABA₄, 267 → 156).

5.6- Determinação das Concentrações de Nitrato

O método utilizado foi o de Cataldo *et al.*, (1975). Amostras de 50 mg de folhas e raízes previamente liofilizadas, foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de água destilada, e estes incubados em banho-maria por 30 minutos a 100 °C. Em seguida foi centrifugada à 3.000 rpm por 10 minutos e retirado o sobrenadante. A reação foi preparada em tubo de ensaio contendo 100 µL do extrato + 200 µL de solução de ácido salicílico 5 % (p/v), em ácido sulfúrico concentrado. Após agitação em agitador do tipo vortex, os tubos foram adicionados lentamente 4.700 µL de NaOH 2N. Em seguida os tubos foram deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. Após foram feitas leituras em espectrofotômetro na absorbância de 410 nm. O branco foi feito usando no ensaio água deionizada em substituição ao extrato. A concentração de nitrato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações crescentes de NO₃⁻ (0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µmol mL⁻¹). Os resultados foram expressos em mmol de NO₃⁻. kg⁻¹ MS de tecido.

5.7- Determinação da Atividade da Redutase do Nitrato

Foi empregado o método *in vivo* preconizado por Hageman & Hucklesby (1971). Foram pesados, aproximadamente, 200 mg de discos de raízes e folhas de 0,5 cm de diâmetro. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio, contendo 5 mL do tampão fosfato 0,1 M, pH=7,5; contendo isopropanol 1% (v/v), KNO₃ Mm e estes cobertos com papel alumínio (tratamento escuro). Em seguida, os tubos foram evacuados com o auxílio de uma bomba de

vácuo, durante 2 minutos. Após, os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C, por 30 minutos, na ausência de luz. Em tubos de ensaio tipo pirex, foram adicionados alíquotas de 1 mL de tampão fosfato + 2 mL do extrato diluído + 1,0 mL de sulfanilamida 1% + 1,0 mL de N-1-naftiletilenodiamina dicloridrato (NNEDA) 0,02%, totalizando um volume final de 5 mL. Em seguida, os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos. A leitura foi no espectrofotômetro à 540 nm contra o branco (3,0mL de tampão fosfato + 1,0 mL de sulfanilamida 1% + 1,0 mL de NNEDA, 0,02 %). O resultado da atividade da redutase do nitrato foi estimada através da produção de NO_2^- no meio de reação, sendo expressa em $\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{g.MF}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a partir de uma curva-padrão obtida com KNO_2 p.a (Sigma).

5.8- Determinação das Concentrações de Amônio Livre

Foi utilizado, segundo o método de Weatherburn (1967), 50 mg de massa seca (MS) das raízes e folhas em pó foram pesados e colocados em tubos de ensaio de 15 mL, adicionando-se 5 mL de água destilada e levados ao banho-maria por 30 min a 100 °C. Após a extração as amostras foram centrifugadas em centrífuga de bancada (1000 rpm) e os sobrenadantes coletados para obtenção do extrato total. Nos tubos de ensaio foram acrescentados 400 μL de extrato total + 2,5 mL da solução A (5 g de fenol + 0,025 g de nitroprussiato de sódio/ 500 mL de água destilada) e homogeneizado em vortex, acrescentando mais 2,5 mL da solução B (2,5 g de NaOH + 12,6 mL de hipoclorito de sódio/ 500 mL de água destilada) e foi novamente agitado em vortex, levando os mesmo tubos ao banho-maria por 20 min a 37 °C. Os tubos foram removidos do banho-maria e em seguida deixados em repouso por 40 min, e levados para fazer a leitura no espectrofotômetro a 625 nm e usando-se água destilada (em substituição ao extrato) + reagentes como branco. As concentrações de amônio livre foram estimadas a partir da curva-padrão construída com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em mmol de NH_4^+ / Kg de MS.

5.9- Determinação da Atividade da Glutamina Sintetase

As folhas e raízes foram trituradas em almofariz banhado em gelo. Adicionou-se 0,2 g de massa seca das raízes e folhas em pó em 5 mL (2mL + 2 mL + 1mL/ 2 minutos cada) de tampão de extração TRIS-HCl 25 mM, pH=7,6, contendo: 10 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ + 10 mM de β -2-mercaptoetanol + P.V.P. 5% (p/v) + 5 mM de EDTA-Na. Depois de trituradas, foram filtradas em pano fino de seda e centrifugadas à 30.000 g (21.000 rpm), em centrífuga

refrigerada à 4 °C , por 30 minutos. O sobrenadante foi congelado para posterior análise.

A atividade da glutamina sintetase foi determinada pelo método “*in vitro*” segundo Kamachi *et al.*, (1991). A reação foi preparada, em tubo de ensaio, com 600 µL de tampão de reação TRIS-HCl 0,25 M, pH=7 + 200 µ L de glutamato de sódio 0,3 M, pH=7 + 200 µ L de ATP 30 mM, pH=7 + 200 µ L de Mg SO₄ . 7 H₂O 0,5 M + 500 µ L de extrato de folhas + 200 µ L de solução de hidroxilamina (NH₂ OH 1,0 M + NaOH 1,0 M, na proporção 1:1). Foi misturado, em vortex e incubado em banho-maria à 30 °C, por 30 minutos. Em seguida, removeu-se os tubos do banho-maria e adicionado 500 µL de solução férrica [FeCl₃ . 6 H₂O 10 % (p/v) em HCl 0,2 M + ácido tricloroacético (T.C.A.) 24 % (p/v) + HCl 50 % (v/v), na proporção 1:1:1] e centrifugado em centrífuga de mesa a 7.000 g, durante 10 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, usando-se água destilada + reagentes (exceto solução de hidroxilamina), como branco. A atividade da glutamina sintetase (GS), foi determinada a partir da curva padrão de γ -glutamil-hidroximato e os resultados foram expressos mmoles de γ -glutamil-hidroximato / kg MS de tecido/hora.

5.10- Determinação das Concentrações de Prolina

Foi utilizado o método descrito por Bates, Waldren & Teare (1973). 50 mg massa seca das raízes e folhas (MS) em pó foram pesados e, em seguida, levados para tubos de ensaio de 15 mL e adicionados 5 mL de água destilada e colocados em banho-maria durante 30 min a 100° C. Após a extração, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos em centrífuga de bancada (1.000 rpm), logo após o processo de centrifugação, foi retirado 1 mL do sobrenadante de cada amostra e transferido imediatamente para os tubos de ensaios, no qual foram adicionados + 1,0 mL de ninhidrina ácida + 1,0 mL de ácido acético glacial (99,5%) (os tubos foram fechados hermeticamente) e agitados em vortex e colocados novamente em banho-maria a 100° C por 1 hora. Após 1 hora, a reação foi interrompida com banho de gelo e adicionando 2,0 mL de tolueno e agitado em vortex por 20 s (o tolueno extraiu a substância cromófora formando um complexo colorido = róseo para vermelho). Assim que foi atingindo a temperatura ambiente, foi feito o processo de aspiração com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico a fase não-aquosa (cromóforo + tolueno = parte superior). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 520 nm usando tolueno como branco. As concentrações de prolina foram determinadas a partir da curva-padrão com L-prolina p.a (Sigma) e os resultados foram expressos em µmol prolina/g MS.

5.11- Determinação das Concentrações de Glicina-Betaína

O método utilizado foi segundo Grieve & Grattan (1983). Foram transferidos 25 mg de massa seca das folhas e raízes para tubos eppendorfs de 2 mL, adicionado 2 mL de água destilada e agitado por 4 h no agitador de mesa a 25 °C (extração a frio), sendo centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 25 °C, após a centrifugação foi coletado o sobrenadante para obtenção do extrato aquoso e descartado o precipitado.

Nos eppendorfs de 2 mL adicionou-se 250 µL do extrato aquoso + 250 µL de H₂SO₄ 2N (diluição da amostra 1:2), e os eppendorfs permaneceram durante 1h no banho de gelo (na geladeira de 0° a 4° C), e adicionado 200 µL de KI-I₂ gelado, mantido durante 16h a 0°C (banho de gelo na geladeira de 0° a 4°C). O processo de centrifugação foi de 15 minutos, 10.000 rpm a 0 °C. eliminando-se o sobrenadante. Foi lavado o precipitado 2 vezes com 2 mL de H₂SO₄ 1N gelado com centrifugações por 5 minutos, 10.000 rpm, 0 °C para cada lavagem (não agitando enquanto estava sendo lavado). Após as lavagens, foi dissolvido o precipitado em 3 mL de 1,2-dicloroetano agitando em vortex e realizando-se diluições 1:6 (diluição para a curva) ou testadas outras maiores (1:12, 1:24 ou 1:48 para as amostras - a diluição vai depender da quantidade de glicina-betaína precipitada). Assim depois de 2 a 2,5 h de descanso, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 365 nm, usando-se água destilada + reagentes, como branco. Durante todo o ensaio foi mantido as amostras entre as temperaturas de 0 °C a 4 °C. Para os cálculos, uma curva padrão de glicina-betaína foi preparada e os resultados foram expressos em mmol.Kg⁻¹ MS.

5.12- Determinação das Concentrações de Aminoácidos Solúveis Totais

A concentração de aminoácidos solúveis totais (AAST) foi determinada segundo método descrito por Peoples *et al.* (1989). Farinhas de tecido vegetal liofilizado de folhas e raízes (50 mg) foram colocadas em tubos de ensaio com 5mL de água deionizada, fechados hermeticamente e incubados em banho-maria a 100°C, durante 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 6.000 x g, por 10 minutos. Após a extração o sobrenadante foi coletado e desenvolvido a reação para dosagem dos aminoácidos. Alíquotas de 0,1 mL do extrato foram colocadas em tubos de ensaio e acrescidas de 0,4 mL de água mille-Q. Em seguida 0,250mL de uma solução tamponada, pH 5,0, contendo 0.2 mol.L⁻¹ de citrato; 0,250mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,1 mmol.L⁻¹ e ninhidrina 5% em methoxy etanol) foi adicionado. Após misturar em vortex os tubos foram hermeticamente fechados e colocados

em banho-maria, onde permaneceram pelo tempo de 15 minutos à temperatura de 100° C. Em seguida, a reação foi interrompida em banho de gelo, momento a qual adicionado 1,5 mL de uma solução de etanol 50% (V/V). Após isso os tubos permanecerem por 20 minutos em temperatura ambiente e em seguida, foi realizada as leituras em espectrofotômetro, a 570nm, sendo os teores de aminoácidos livres totais, determinado com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma mistura padronizada de L – glutamina.

5.13- Determinação das Concentrações de Proteínas Solúveis Totais

As concentrações de proteínas solúveis totais foram determinadas segundo o método de Bradford (1976). Em tubos de ensaio de 15 mL foram adicionados 100 mg de pó da matéria seca (MS) das raízes e folhas em 5,0 mL do tampão de extração (Tris-HCl 25 mM pH 7,6). Em seguida os tubos ficaram sobre o processo de agitação durante 2 horas no agitador de mesa, com os tubos devidamente lacrados. Após a extração, os tubos foram centrifugados em centrífuga de bancada (2000 rpm por 10 minutos). Foram colocados nos tubos de ensaios 100 µL do sobrenadante após a centrifugação + 2,5 mL do reagente de Bradford. Após este processo os tubos manualmente foram agitados delicadamente (para não desnaturar as proteínas). Com 15 min. de repouso as leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 595 nm, contra o branco que encerra 100 µL de água + 2,5 mL do reagente de Bradford. As concentrações de proteínas solúveis totais foram estimadas a partir da curva-padrão construída com soro albumina bovina p.a (Sigma). Os resultados foram expressos em mg proteína/ g MS.

5.14- Determinação das Concentrações de Amido

O método utilizado foi segundo Dubois *et al.*, (1956). Foi feita uma extração etanólica (50 mg do pó da matéria seca (das raízes e folhas) / 5,0 mL de etanol 80%, 30 min a 80° C) e depois foi feita uma nova extração, sendo que agora com 5,0 mL de HClO₄ 30% por 30 minutos a 25 °C. A primeira e a segunda extração foram levadas para centrifugar (2000 rpm por 10 minutos) e coletados os sobrenadantes. Os sobrenadantes de cada extração foram unidos e aferidos ao volume para 10 mL com água destilada para obtenção do extrato total. Nos tubos de ensaio foram colocados 100 µL do sobrenadante + 400 µL de H₂O destilada e posteriormente agitando-se em vortex, em seguida adicionando-se 0,5 mL de fenol 5% e agitando no vortex, logo depois foi adicionado uniformemente e de uma única vez no centro do tubo (com pipeta graduada) 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado e novamente feita a agitação

dos tubos em vortex e levado após 20 min de repouso ao espectrofotômetro a 490 nm. Para o cálculo das concentrações de amido utilizou-se uma curva-padrão de glicose e os resultados mmol de glicose/g de resíduo.

5.15- Determinação das Concentrações de Sacarose

As determinações das concentrações de sacarose foram feitas segundo o método de Van Handel (1968). 30 mg de massa seca das raízes e folhas foram homogeneizadas em tubos de eppendorf de volume de 2,0 mL, contendo 1,5 mL de solução de MWC (metanol, clorofórmio e água; 12:5:3 v/v/v), e agitado em um agitador de mesa durante 30 minutos a temperatura ambiente. A solução foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos e coletado o sobrenadante e o resíduo, foram novamente extraídos com igual volume de MWC, seguindo-se uma nova centrifugação e coleta dos sobrenadantes, no qual os mesmos foram reunidos para obtenção do extrato total.

A cada 2,0 mL do sobrenadante adicionou-se 0,5 mL de clorofórmio e 750 µL de água deionizada, seguindo-se sob agitação e centrifugação (2000 rpm, 10') para a separação da fase aquosa. Após esse processo foi retirada com uma pipeta de Pasteur a fração aquosa metanólica (superior) e transferido para tubos de ensaio, a partir daí os tubos com a fração aquosa metanólica foram levados ao banho-maria e aquecidos a 35°C por um período de 30 minutos a 45 minutos para evaporação do clorofórmio residual e então foi determinado o volume restante.

A quantificação das amostras foi realizada tomando-se alíquotas de 100 µL da fase aquosa adequadamente diluída, adicionando 100 µL de KOH 30%. Após a vigorosa agitação a mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos e, após o resfriamento, foi adicionado imediatamente 3,0 mL de solução de antrona 0,2 %, em ácido sulfúrico e a mistura ficou sob agitação e aquecida a 40°C por 20 minutos respectivamente. Após resfriamento, agitaram-se as amostras por 10 segundos e foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 620 nm. Para os cálculos, uma curva padrão de sacarose foi preparada e os resultados foram expressos em mg de sacarose/ g MS.

5.16- Determinação da Concentração de Carboidratos solúveis Totais

Foi utilizado, segundo Dubois *et al.*, (1956),. 50 mg de massa seca (MS) das raízes e folhas em pó foram pesados e colocadas em tubos de ensaio de 15 mL e homogeneizados com

5 mL de água destilada e colocados em banho-maria por 30 min. a 100° C. Os tubos de ensaio foram retirados do banho-maria e levados para extração das amostras através da centrifugação em centrífuga de bancada (1000 rpm) durante 10 minutos, retirou-se uma alíquota de 100 µL do sobrenadante (realizando o teste de diluição) junto com 400 µL de H₂O em tubos de ensaio e sob agitação e homogeneização através do vortex. Depois foi adicionado 0,5 mL de fenol 5% e agitando novamente vortex e adicionado uniformemente e de uma única vez no centro do tubo (com pipeta graduada) 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Assim, foram agitados os tubos colocados na bancada para repouso por 20 minutos e sua leitura foi feita no espectrofotômetro a 490 nm, tendo como o branco a utilização de água destilada (em substituição ao extrato) + reagentes, que foram colocados nas seguintes proporções de 0,5 mL de água destilada + 0,5 mL de fenol 5% + 2,5 mL de H₂SO₄. Para o cálculo das concentrações de carboidratos solúveis totais utilizou-se uma curva-padrão de glicose e os resultados foram expressos mmol de glicose/ g MS.

5.17- Atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase

Para a extração das proteínas, os tecidos vegetais foram então homogeneizados em meio extrator, com a seguinte composição em mol.m-3: tampão Tris-HCl (pH 6,8), 50 ; Na⁺ 110; EDTA, 1; tiamina pirofosfato (TPP), 0.5; Mg⁺² , 2,5 e ditioneitol (DTT), 2. Em seguida, foi feita a centrifugação a 20000 g por 10 minutos a 4 °C. Alíquotas de 100 mL do sobrenadante foram adicionadas à mistura de incubação específica para cada enzima, cujo volume final foi de 3 mL. A mistura de incubação para a álcool desidrogenase foi composta em mol.m-3 por tampão Tris-HCl (pH 8,9), 50; ditioneitol (DTT) 2; bNAD 0,25; e 100 mL de etanol a 96%. A reação foi quantificada na direção da oxidação do etanol (BERTANI *et al.*, 1980). A mistura de incubação para a lactato desidrogenase foi composta em mol.m-3 por tampão Tris-HCl (pH 9,9), 50; glicina, 100; sulfato de hidrazina, 5; e 100 mL de lactato de sódio. A reação foi quantificada na direção da oxidação do lactato (HOFFMAN & HANSON, 1986). Após três minutos a 25 °C, a atividade das enzimas foi quantificada a 340 nm, utilizando-se NAD + H⁺ como padrão.

5.18- Determinação dos Teores de Clorofila a, b, total (a+b) e Carotenóides

O método utilizado foi segundo Lichthenthaler (1987). Foram coletados 100 mg de tecido foliar e homogeneizado a amostra num almofariz, com 0,1g de CaCO₃, uma pitada de

areia e 5 mL de acetona 80% em abrigo de luz. Verteu o extrato num tubo de centrifuga de mesa e foi lavado o almofariz por duas vezes com 5 mL de acetona 80%. O tubo foi envolvido com papel alumínio. Depois o tubo foi centrifugado por 10 min, a 10 °C, a 6000 rpm. Verteu-se o sobrenadante cuidadosamente em balão com volume de 25 mL encapado com papel alumínio, e completado o volume com acetona a 80%. Foi tomada uma alíquota e lido a absorvância a 470, 646,8 e 663,2 nm. O extrato não foi exposto à luz durante as leituras. Os valores de absorvância que não se situaram entre 0,2 e 0,8 foi feita uma diluição do extrato. Ao diluir o volume foi completado sempre com acetona a 80%. As concentrações de clorofilas e carotenóides (em mg L⁻¹), foram calculadas e transformadas para mmol Kg⁻¹ MF pelas seguintes fórmulas:

$$\text{- Clorofila } a = C_a = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$\text{- Clorofila } b = C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{- Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

$$\text{- Carotenóides (xantofila + carotenos)} = (1000 A_{470} - 1,82 C_a - 85,02 C_b) / 198$$

5.19- Crescimento

As determinações do crescimento foram baseadas em mensurações realizadas no final do período experimental. Foram mensurados:

1. Altura de Planta – medida da superfície do solo até o ápice da planta, através do uso de uma trena. O resultado foi expresso em cm.
2. Diâmetro do Coleto – medido utilizando-se um paquímetro digital 200 mm da Digimes. O resultado foi expresso em cm.
3. Área Foliar – determinada usando um medidor portátil de área foliar da ADC, modelo AM300. O resultado foi expresso em mm².
4. Número de Folhas – a contagem do número de folhas vivas foi realizada no nono dia de estresse.
5. Massa Seca – no final das determinações das variáveis estudadas, as plantas de cada tratamento, após retirada dos vasos, foram levadas ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, onde foram separadas em raiz e parte aérea e colocadas dentro de sacos de papel de massa conhecida, onde foram levados a uma estufa de ventilação forçada à 65°C onde permaneceram até peso constante. Cada parte da planta foi pesada em uma balança analítica com precisão de 0,001g para a determinação da massa seca da raiz, parte aérea e total, com os valores dos pesos das massas secas da raiz e da parte aérea foi calculada a razão entre a parte aérea e raiz.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Potencial Hídrico da Folha, Transpiração, Condutância Estomática e Concentrações de Ácido Abscísico (ABA)

O potencial hídrico foliar (ψ_f), a transpiração (E), a condutância estomática (g_s) e as concentrações de Ácido Abscísico (ABA) foram afetadas tanto nas plantas sob alagamento como nas plantas sob déficit hídrico, quando comparadas com as plantas controle (Figura 2).

Em relação ao ψ_f , ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle e sob alagamento apresentaram -0,2 e -2,3 MPa, respectivamente, caracterizando um decréscimo de 1050 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico com -2,9 MPa, tiveram um decréscimo de 1350 % em relação às plantas controle (Figura 2 A).

As plantas controle, sob déficit hídrico e alagamento apresentaram as taxas de transpiração de 1,80, 0,19 e 0,02 mol.m².s⁻¹, respectivamente. Na taxa de transpiração ocorreu variação significativa entre os tratamentos, sendo as plantas sob alagamento tendo um decréscimo de 89 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 99 % em relação às plantas controle (Figura 2 B).

A condutância estomática variou significativamente entre os tratamentos, sendo que nas plantas controle e sob alagamento foram obtidos os valores de 0,38 e 0,02 mol.m².s⁻¹, respectivamente. O alagamento proporcionou um decréscimo de 94,7 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico com 0,08 mol.m².s⁻¹, tiveram um decréscimo de 78,9 % em relação às plantas controle (Figura 2 C).

Os níveis de ácido abscísico (ABA) presentes nas folhas das plantas controle, déficit hídrico e alagamento foram 38,42, 98,52 e 4,62 ng g⁻¹ MS, respectivamente. Estas concentrações revelam uma variação significativa entre os tratamentos, sendo que as plantas sob alagamento obtendo um decréscimo de 87,9 % e as plantas sob déficit hídrico um aumento de 156,4 %. Em relação às raízes as concentrações de ABA foram 60,43, 158,61 e 8,13 ng g⁻¹ MS, nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente. O tratamento sob deficiência hídrica teve um acréscimo de 162,5 % e decréscimo de 86,5% nas plantas sob alagamento, em relação às plantas controle (Figura 2 D).

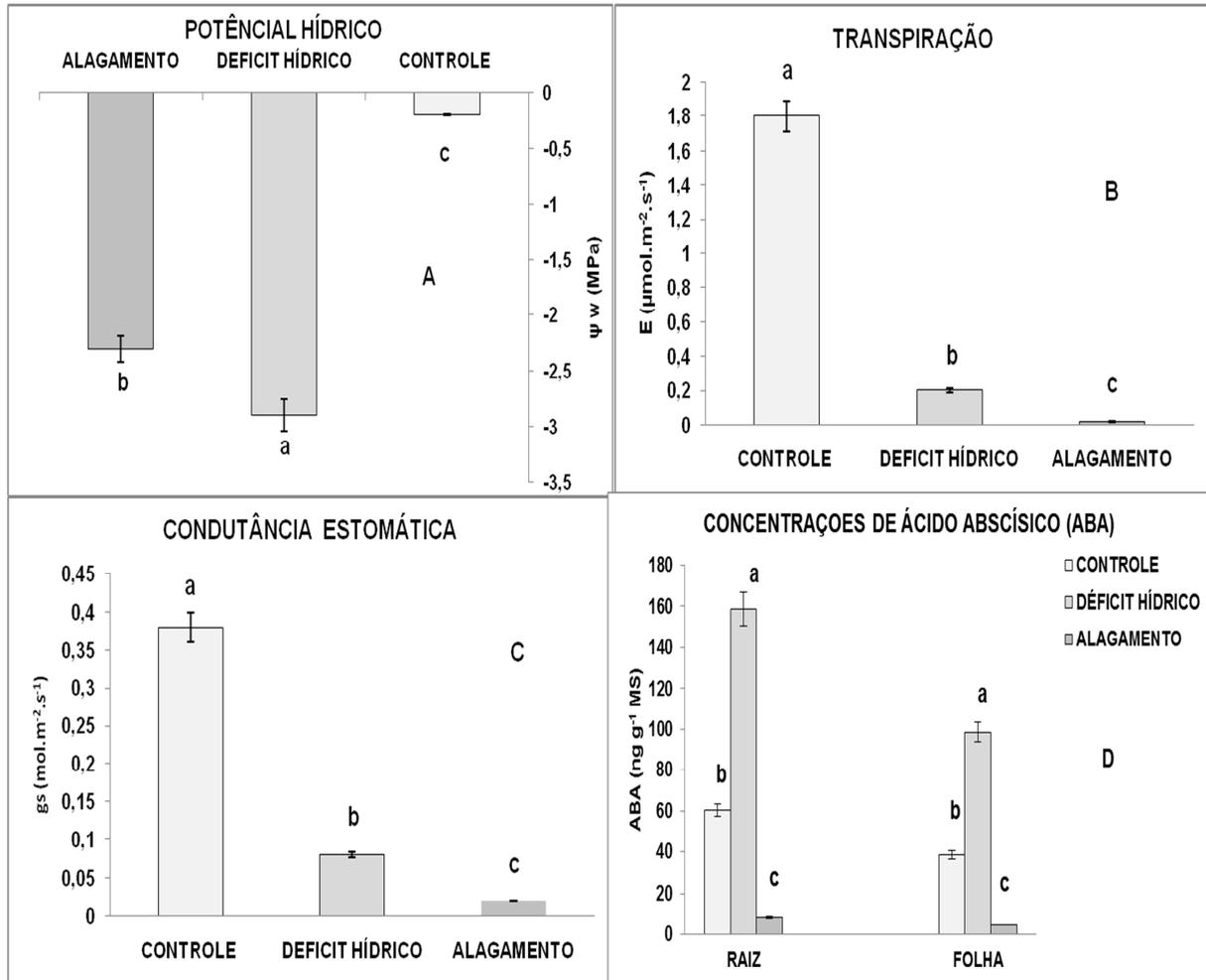


Figura 2. Potencial hídrico (A), Transpiração (B), Condutância Estomática (C) e Concentrações de Ácido Abscísico (D) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias.

Ocorreu uma diminuição do potencial hídrico nas plantas sob déficit hídrico, devido a menor disponibilidade de água no solo, para assim gerar um gradiente e favorecer a absorção de água pela planta (Figura 2 A). Resultados semelhantes encontrados por Larcher (2000) e Taiz & Zeiger (2004).

O decréscimo na disponibilidade de água no solo ocasiona queda no potencial da água nas folhas das plantas, levando à perda de turgescência e à redução da condutância estomática (Figura 2 A) (Figura 2 C), gerando uma redução da transpiração conforme observado na figura 2 B. Resultados semelhantes encontrados por Shalhevet,(1983).

O potencial hídrico nas plantas sobre alagamento diminui devido à falta de energia para os processos fisiológicos e também, uma diminuição na absorção de íons responsáveis pelo desenvolvimento das raízes, reduzindo a quantidade de pêlos absorventes. Outro processo envolvido é a redução do processo metabólico e a decomposição das raízes através do

processo fermentativo, promovendo assim, uma diminuição da absorção de água e minerais para a planta, (Figura 2 A). Resultados condizentes com o que preconizam Taiz & Zaiger, (2004) e Kerbaui (2004).

A diminuição da transpiração pode estar relacionada com a resposta da planta ao alagamento, que consiste no fechamento estomático que pode ser total ou parcial (Figura 2 B) (Figura 2 C). Uma das causas da diminuição da transpiração pode ser atribuída à diminuição do suprimento de água pelo decréscimo da condutividade hidráulica das raízes ou pela morte de raízes, causando queda no potencial hídrico das folhas. Resultados semelhantes foram obtidos por Matsui & Tsuchiya, (2006) e Pelacani *et al.*, (1995).

Os resultados obtidos nesta pesquisa sobre condutância estomática durante o alagamento são similares com os observados por Batista *et. al* (2008) investigando plantas de *Cecropia pachystachya* sob alagamento.

Nas raízes anóxicas ou hipóxicas ocorre falta de energia suficiente para sustentar processos fisiológicos dos quais dependem as partes aéreas (TAIZ & ZAIGER; 2004). Experimentos têm mostrado que a deficiência das raízes de trigo ou cevada em absorver íons de nutrientes e transportá-los para o xilema (e deste para a parte aérea) rapidamente leva à escassez de íons nos tecidos em desenvolvimento e expansão. As folhas velhas senescem prematuramente por causa da realocação de elementos móveis no floema (N, P, K) para as folhas jovens. A permeabilidade mais baixa das raízes à água, freqüentemente leva a um decréscimo do potencial hídrico da folha e à murcha, embora este decréscimo seja temporário se os estômatos fecharem, evitando mais perda de água por transpiração como foi observado no nosso trabalho (Figura 2 B) (Figura 2 C).

Isso nos mostra a ação do ABA em resposta ao déficit hídrico, tendo em vista que o ABA diminui a condutância estomática (Figura 2 C) e conseqüentemente a redução da transpiração (Figura 2 B) a curto prazo.

Segundo Liu & Baird (2003) o ABA em longo prazo promove a síntese de proteínas como a LEA, enzimas da biosíntese da prolina, enzimas antioxidantes, entre outras. Em último estágio o ABA atua na redução da parte aérea e crescimento radicular. Isto se deve para evitar a perda excessiva de água por transpiração nas folhas bem como buscar novas fontes de água pelo sistema radicular.

As concentrações de ABA nas raízes foram maiores quando comparadas com as concentrações nas folhas devido sua síntese ser realizada nesse órgão (Figura 2 D). Contudo nas plantas sob alagamento as concentrações de ABA tanto nas raízes quanto nas folhas foram menores que nas plantas controle, isso ocorreu devido à morte do sistema radicular, onde é

realizada a sua síntese, contudo não havendo ABA para ser translocado para as folhas, evidenciando a sensibilidade da planta a hipóxia ou anoxia (Figura 2 D), outra hipótese é que a baixa concentração de ABA (Figura 2 D) esteja ligada a deficiência na formação de carotenoides (Figura 8), devido a biossíntese do ABA estar dividida em 3 (três) etapas: 1- síntese dos carotenóides não oxigenados nos plastídeos; 2- síntese e clivagem dos carotenóides oxigenados (xantofilas) nos plastídeos; 3- síntese do ABA no citossol .

Resultados semelhantes sobre o aumento nos níveis de ABA foram reportados Liu, *et al* (2005), investigando plantas *Solanum tuberosum* induzidas a deficiência hídrica.

6.2- Concentrações de Nitrato e Atividade da Redutase do Nitrato

As concentrações de nitrato na folha nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento foram de 0,68, 0,13 e 0,01 $\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente. Em relação as raízes os níveis de nitrato foram de 0,58; 0,18 e 0,02 $\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente (Figura 3 A).

As concentrações de nitrato na folha variaram significativamente entre os tratamentos, sendo as plantas sob alagamento tiveram um decréscimo de 98,5 %, já as plantas sob déficit hídrico apresentaram uma redução de 80,8 %, em relação às plantas controle. Para as raízes foi observada uma redução de 96,5 % nas plantas sob alagamento e também uma queda de 69 % nas plantas sob déficit hídrico (Figura 3 A).

A atividade da redutase do nitrato variou significativamente entre os tratamentos, tanto nas raízes quanto nas folhas. Nas folhas das plantas sob alagamento tiveram o valor de 0,01 $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$, com o decréscimo de 96,8 %, quando comparado às plantas controle (0,32 $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$). Nas plantas sob déficit hídrico obteve um valor de 0,08 $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ ocorrendo um decréscimo de 75 %. Nas raízes os valores observados foram 0,35, 0,09 e 0,01 $\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$ nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente, com um decréscimo de 74,3 e 97 % para o déficit hídrico e alagamento, respectivamente (Figura 3 B).

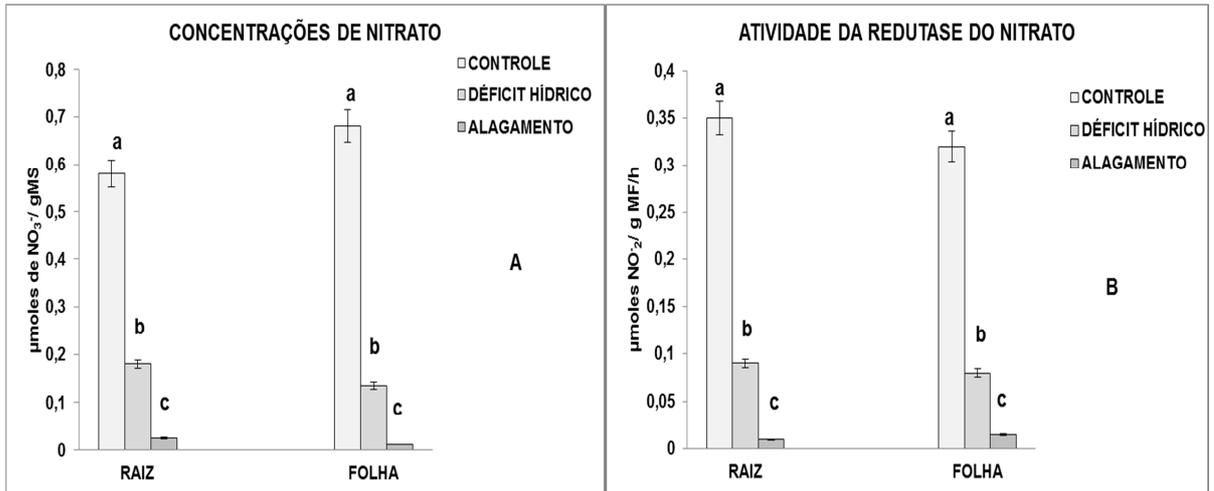


Figura 3. Concentrações de Nitrato (A) e Atividade da Redutase do Nitrato (B) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias.

Ocorreu uma diminuição da concentração de nitrato nas plantas sob déficit hídrico, tanto nas raízes quanto nas folhas (Figura 3 A), que se deve a diminuição de água no solo que reduziu a absorção de NO_3^- pelas raízes, comprovado pela diminuição do potencial hídrico (Figura 2 A), o qual seria levado para a folha através do fluxo transpiratório atenuando a atividade da enzima redutase do nitrato nas folhas. Já em plantas sob alagamento a diminuição da concentração de nitrato tanto nas raízes quanto nas folhas (Figura 3 A) se deve a redução da energia das raízes devido à anoxia e conseqüente diminuição do potencial hídrico (Figura 2 A).

A diminuição na atividade da redutase do nitrato em plantas sob alagamento (Figura 3 B) deve-se provavelmente a falta de oxigênio no solo, que ocasionou a falta de energia (ATP) para a absorção do nitrato do solo, ocasionando uma diminuição do nitrato que vai para as folhas (Figura 3 A). Já o déficit hídrico diminui a atividade dessa enzima (Figura 3 A) em virtude da diminuição do fluxo de água pela corrente transpiratória, diminuindo a transpiração (Figura 2 B) e com isso também o fluxo de nitrato para as folhas (Figura 3 A) uma vez que essa enzima é altamente dependente de seu substrato.

A interação nitrogênio versus condição hídrica do solo é importante porque esse nutriente freqüentemente limita o crescimento das plantas cultivadas em ambientes de pouca pluviosidade e em solos de baixa fertilidade. Além disso, existem evidências na literatura que o N e a disponibilidade de água no solo limitam o crescimento, dentre outros fatores, pela limitação na aquisição e assimilação desse nutriente (SILVEIRA, *et. al*; 2003).

Foyer *et. al* (1998) trabalhando com plantas de *Zea mays* sob deficiência hídrica, descreveu significativa queda na atividade da redutase do nitrato, sendo tais resultados semelhantes com os obtidos neste estudo durante a deficiência hídrica.

6.3- Concentrações de Amônio Livre e Atividade da Glutamina Sintetase (GS)

As concentrações de amônio livre na folha foram de 18,6; 24,5 e 10,3 mmols GGH. Kg⁻¹ MS nas plantas controle, sob deficiência hídrica e submetida ao alagamento, respectivamente (Figura 4 A). Adicionalmente, estes dados revelam uma queda de 44,6 % nas sob alagamento e um aumento de 31,7 % nas plantas sob déficit hídrico, quando comparados ao controle. Os resultados ligados aos níveis de amônio livre nas raízes dos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento apresentaram 14,1, 20,4 e 6,2 mmols GGH. Kg⁻¹ MS, respectivamente, indicando reduções de 56 % nas plantas submetidas ao alagamento e um aumento de 44,7 % nas plantas submetidas ao déficit hídrico.

A atividade da glutamina sintetase (GS) nas folhas foi afetada significativamente tanto nas plantas sob alagamento (2,4 mmols GGH. Kg⁻¹ MS), quanto nas plantas sob déficit hídrico (11 mmols GGH. Kg⁻¹ MS), quando comparadas com as plantas controle (27 mmols GGH. Kg⁻¹ MS) (Figura 4 B). Os resultados nas folhas quando submetidos o déficit hídrico e alagamento indicam reduções de 59,2 e 91 %, respectivamente, se comparado ao tratamento controle. A atividade desta enzima nas raízes foram 62,2 e 96,2 % menor nos tratamentos sob deficiência hídrica (14 mmols GGH. Kg⁻¹ MS) e alagamento (1,4 mmols GGH. Kg⁻¹ MS), respectivamente, quando comparado as plantas controle (37 mmols GGH. Kg⁻¹ MS) (Figura 4 B).

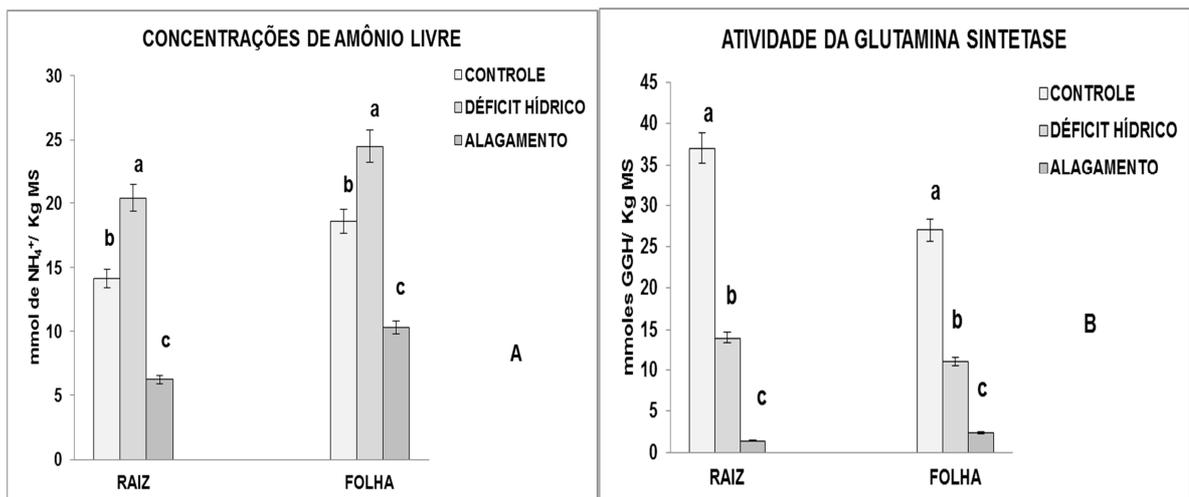


Figura 4. Concentrações de Amônio Livre (A) e Atividade da Glutamina Sintetase (B) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. **As barras representam os desvios padrões das médias.

O aumento nas concentrações de amônio livre nas plantas sob déficit hídrico (Figura 4 A) pode estar ligado às outras rotas para formação do amônio livre, como a rota do glutamato

desidrogenase (GDH), que atua na dependência de NADH, desaminando o glutamato gerando amônio (NH_4^+) e o 2-Oxiglutarato, promovendo assim um acúmulo de amônio devido o aumento da sua produção e a redução da atividade da enzima glutamina sintetase (Figura 4 B). Entretanto nas plantas sob alagamento a diminuição das concentrações de amônio livre nas raízes é devido à diminuição da rota GS-GOGAT, devido não gerar o glutamato para que possa ser usada a rota do glutamato desidrogenase (GDH) para a produção de amônio (NH_4^+), uma vez que a planta não tolera hipóxia, ocorrendo a morte do sistema radicular, assim não havendo mais a assimilação do Nitrogênio tanto na forma de nitrato (NO_3^-) como na forma de amônio (NH_4^+), além do mais, em solos alagados a nitrificação fica prejudicada aumentando os níveis de amônio (NH_4^+) no solo e diminuindo os níveis de nitrato (NO_3^-) disponíveis no solo em função da baixa disponibilidade de oxigênio.

As plantas sob alagamento e sob déficit hídrico tiveram uma diminuição altamente significativa na atividade da Glutamina Sintetase (GS) (Figura 4 B) quando comparados com as plantas controle. Isso evidencia que a atividade desta enzima reduziu nas plantas desses tratamentos devido às baixas concentrações de ATP no meio celular, haja vista que essa enzima é altamente dependente de energia na forma de ATP, gerado pelos fotossistemas na fase fotoquímica da fotossíntese.

Este fato se deve provavelmente a redução drástica da atividade da RN (Figura 3 B) sob déficit hídrico e alagamento. Contudo, a atividade enzimática no déficit hídrico não ficou totalmente inativa, pois a GS precisa de amônio como substrato, este amônio pode vir de outras rotas metabólicas como as desaminações, fotorrespiração a partir da oxidação da glicina, catabolismo das proteínas e síntese de lignina. Resultados semelhantes foram observados por Ferreira *et al.*, (2002). Entretanto, nas plantas sob alagamento a atividade da GS foi extremamente baixa (Figura 4 B) devido a baixa concentração de nitrato (NO_3^-) (Figura 3 B), a baixa atividade da aRN (Figura 3 B), conseqüentemente uma baixa concentração de amônio (NH_4^+) (Figura 4 A), juntamente com a baixa concentração de ATP, gerando assim uma baixa atividade da GS (Figura 4 B).

6.4- Concentrações de Prolina, Glicina-Betaína, Aminoácidos Solúveis Totais e Proteínas Solúveis Totais

As concentrações de Prolina, Glicina-Betaína, Aminoácidos Solúveis Totais e Proteínas Solúveis Totais foram afetadas tanto nas plantas sob alagamento como nas plantas sob déficit hídrico, quando comparadas com as plantas controle (Figura 5).

Em relação às concentrações de Prolina nas folhas, ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob déficit hídrico e sob alagamento apresentaram 2,60; 4,10 e 0,15 $\mu\text{mol Pro g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, caracterizando um acréscimo de 57,7 % nas plantas sob déficit hídrico e um decréscimo de 94,2 % nas plantas sob alagamento, quando comparadas com as plantas controle. Para as raízes ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob déficit hídrico e sob alagamento apresentaram 1,9; 2,8 e 0,2 $\mu\text{mol Pro g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, caracterizando um acréscimo de 47,4 % nas plantas sob déficit hídrico e um decréscimo de 89,5 % nas plantas sob alagamento, quando comparadas com as plantas controle (Figura 5 A).

As plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram concentrações de Glicina-betaína nas folhas de 22,0; 3,9 e 31,0 $\mu\text{g de Glicina-betaína g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, variando significativamente entre os tratamentos, caracterizando um decréscimo de 82 % nas plantas sob alagamento e um acréscimo de 41 % nas plantas sob déficit hídrico. Para as raízes ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram 16,0; 2,2 e 24,0 $\mu\text{g de Glicina-betaína g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, caracterizando um decréscimo de 86,2 % nas plantas sob alagamento e um acréscimo de 50 % nas plantas sob déficit hídrico, quando comparadas com as plantas controle (Figura 5 B).

As concentrações de Aminoácidos Solúveis Totais nas folhas variaram significativamente entre os tratamentos, sendo as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico com 59,53; 14,14 e 75,65 $\mu\text{mol de AA g}^{-1}\text{MS}$, respectivamente, caracterizando um decréscimo de 76,2 % nas plantas sob alagamento e um aumento de 27,1 % nas plantas sob déficit hídrico. Em relação às raízes as concentrações de Aminoácidos Solúveis Totais foram de 51,74; 6,43 e 67,81 $\mu\text{mol de AA g}^{-1}\text{MS}$, para as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico, respectivamente, tendo um decréscimo de 87,6 % para as plantas sob alagamento e um acréscimo de 31,1 % quando comparados com as plantas controle. (Figura 5 C).

Em relação às concentrações de Proteínas Solúveis Totais nas folhas ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram 3,5; 0,5 e 1,2 mg de Proteína g^{-1}MS , respectivamente, caracterizando um decréscimo de 85,7 % nas plantas sob alagamento e 65,7 % nas plantas sob déficit hídrico quando comparadas com as plantas controle. Nas raízes as concentrações de Proteínas Solúveis Totais apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, sendo as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram 3,1; 0,3 e 0,9 mg de

Proteína g^{-1} MS, respectivamente, caracterizando um decréscimo de 96,3 % nas plantas sob alagamento e 71 % nas plantas sob déficit hídrico quando comparadas com as plantas controle (Figura 5 D).

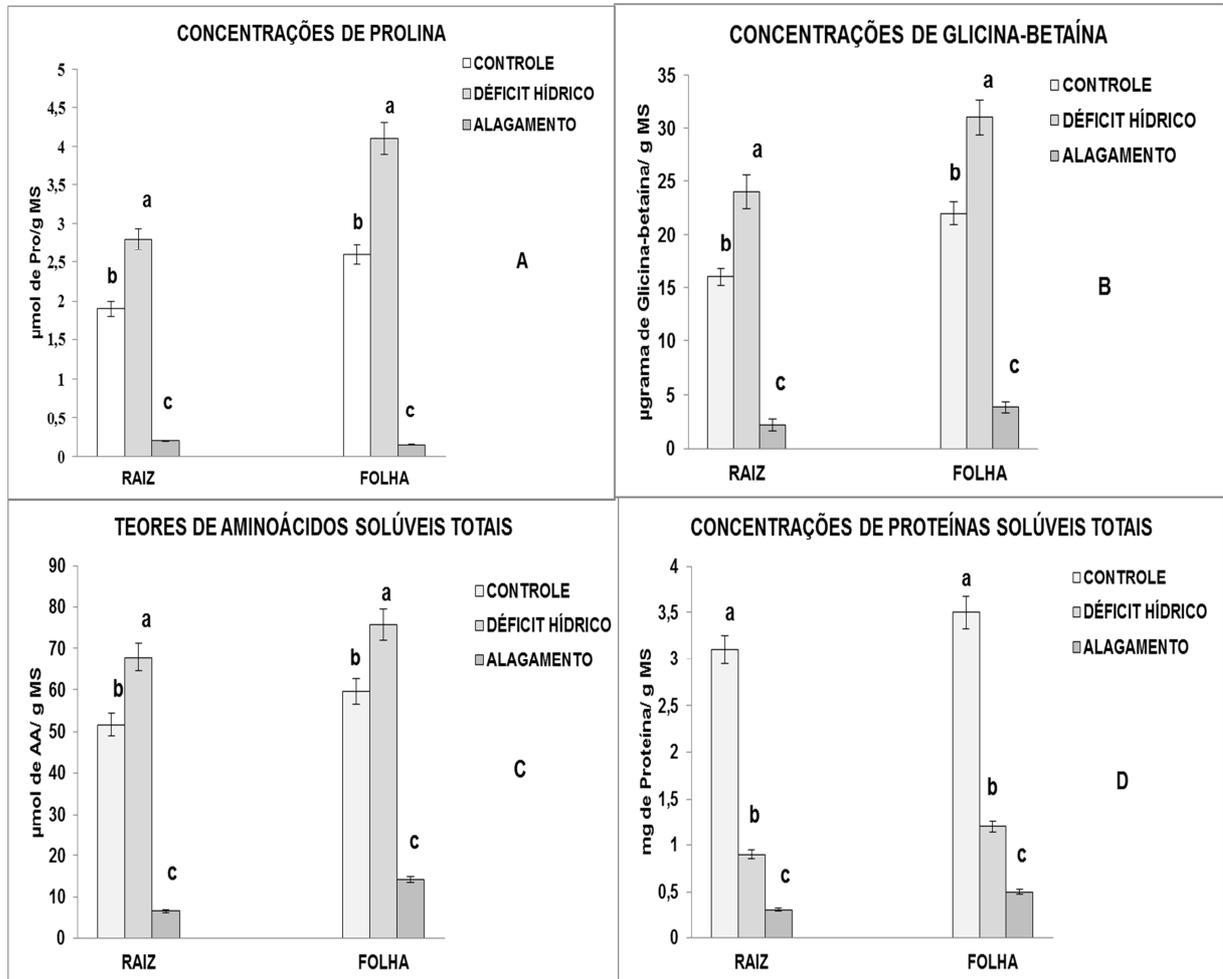


Figura 5. Concentrações de Prolina (A), Glicina-Betaina (B), Aminoácidos Solúveis Totais (C) e Proteínas Solúveis Totais (D) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias

As plantas sob déficit hídrico tiveram um aumento na concentração de prolina (Figura 5 A), que está relacionada ao aumento da atividade das enzimas proteolíticas promovendo uma disponibilidade maior de aminoácidos livres (Figura 5 C) como a prolina, que protege os tecidos vegetais contra esse estresse por servirem como reserva de nitrogênio, osmo-soluto e protetor hidrofóbico de enzimas e estruturas celulares. Resultados semelhantes observados por Madan *et al.*, (1999).

O mecanismo de acúmulo de prolina em situações estressantes, entretanto, ainda não está claramente entendido, o decréscimo nos níveis de proteína (Figura 5 D) poderia refletir em uma diminuição da síntese ou em um aumento da degradação, levando a altos níveis de

aminoácidos livres (Figura 5 C). O maior teor de prolina pode ser devido, também, à maior atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina (ornitina aminotransferase e pirrolina-5-carboxilase redutase), sendo que os efeitos de deficiência hídrica dependem da espécie, tecido e idade, tanto quanto da natureza, duração e intensidade do estresse, não é surpreendente que diferenças venham sendo encontradas no padrão de aminoácidos em plantas sob condição de estresse. Resultados semelhantes observados por Madan *et al.*, (1999).

Em condições de estresse, o metabolismo de aminoácidos é amplamente alterado, sendo a síntese de proteínas diminuída e a proteólise aumentada. Como consequência disto, ocorre à indução da biossíntese de prolina promovida pelo incremento de metabólicos como poliaminas, amônia, arginina, ornitina, glutamina e glutamato.

Em plantas sob alagamento a redução de prolina livre (Figura 5 A) pode ser atribuída ao comprometimento de sua síntese, já que sua precursora tem sua expressão regulada por mudanças no potencial osmótico do citoplasma, e esta foi afetada devida a deficiência de oxigênio acarretar alteração no pH celular, perda de água na célula e acúmulo de compostos tóxicos. Os resultados observados nesta pesquisa são similares aos descritos por Oliveira Neto *et al.* (2009 a), avaliando plantas de *Sorghum bicolor* sob restrição hídrica.

A glicina-betaína é utilizada para proteger a planta, mantendo o equilíbrio da água entre a célula vegetal e o ambiente, estabilizando as macromoléculas. Nas plantas sob déficit hídrico, o alto valor de glicina-betaina se deve a provável formação de aminoácidos solúveis totais (Figura 5 C) através da degradação das proteínas solúveis (Figura 5 D) e das altas concentrações de amônia (Figura 4 A), vindo possivelmente da fotorrespiração e processos de desaminações. Estes processos são fundamentais para a formação das betaínas, também, a glicina-betaína é sintetizada a partir da colina ou da glicina.

As maiores concentrações de glicina-betaína em plantas sob déficit hídrico (Figura 5 B) tanto na folha quanto na raiz, mostra haver parecer uma contribuição para obter uma melhor absorção e transporte de água do solo à parte aérea por meio de ajustamento osmótico e também uma proteção da membrana celular, bem como proteção contra o mecanismo do estresse oxidativo das plantas. Com isso, o acúmulo ocorreu provavelmente para proteger o metabolismo vegetal devido à glicina-betaína atuar como osmólito compatível.

Já nas plantas sob alagamento as concentrações de glicina-betaína diminuíram drasticamente (Figura 5 B) quando comparadas com as plantas controle, isso parece ocorrer por esta não funcionar somente como osmoprotetora, mas também, através da síntese de outros precursores funcionarem em via metabólica para formarem compostos ligados à síntese

do hormônio etileno, uma vez que a presença deste fitohormônio é comum em plantas em hipóxia. Portanto, os resultados indicam que a redução deste osmólito deva ser atribuída simplesmente ao efeito de resposta ao alagamento.

Lobato *et. al* (2009 b) reportou comportamento semelhante sobre o aumento nos níveis de glicina-betaina em plantas de *Capcium annuum* expostas a restrição hídrica.

O aumento nas concentrações de aminoácidos nas plantas sob déficit hídrico se deve principalmente a atividade das enzimas proteases quebrando as proteínas em aminoácidos, além da diminuição da síntese da mesma (Figura 5 C e 5 D).

O acúmulo de aminoácidos pode ser decorrente, provavelmente da restrição da síntese de proteínas, bem como dos distúrbios pela deficiência hídrica nos tecidos do floema, reduzindo a translocação para outros órgãos. Esses compostos promovem o abaixamento do potencial osmótico e da manutenção da turgescência, que serve de reserva de nitrogênio para a possível retomada do crescimento quando as tensões ambientais amenizarem ou terminarem. Sendo assim, o acúmulo de aminoácidos (Figura 5 C) pode ser considerado como um sinal de tolerância das plantas sob diferentes estresses ambientais. Resultados semelhantes observados por Szegletes *et al.*,(2000) e Subbarao *et al.*,(2000). Nas plantas sob alagamento houve uma redução nas concentrações de aminoácidos (Figura 5 C), isto se deve provavelmente a baixa atividade da enzima glutamina sintetase (Figura 4 B), enzima chave ou conhecida como porta de entrada para formação de todos os aminoácidos nas raízes e nas folhas.

A diminuição nas concentrações de proteínas (Figura 5 D) sob déficit hídrico e alagamento em folhas e raízes quando comparadas com a controle se devem provavelmente, ao incremento da atividade das enzimas proteolíticas, que quebram as proteínas de reserva das plantas e também da diminuição da síntese das mesmas. O déficit hídrico nas plantas afeta todos os processos bioquímicos das mesmas, como forma de defesa pela falta de água, principalmente a degradação das proteínas em aminoácidos (Figura 5 C), de modo especial a prolina (Figura 5 A), que atuam diretamente no ajustamento osmótico da planta, aumentando assim os níveis de aminoácidos nas plantas (Figura 5 C). Segundo Xiong; Scumaker & Zhu (2002), algumas proteínas envolvidas na interação hidrofílica com macromoléculas celulares são sintetizadas visando estabilizar o metabolismo e atuar na recuperação dos danos ocasionados pelo estresse hídrico.

A restrição na absorção de água diminui a turgescência celular e causa paralisação do crescimento (Figura 10 D) causando, provavelmente, um aumento das enzimas proteolíticas, que quebram as proteínas estocadas nas plantas, e uma diminuição da síntese de proteínas,

mostrando que esta deficiência afeta todos os processos bioquímicos na tentativa de manter os níveis de água na planta, assim como o balanço osmótico celular.

Nas plantas submetidas ao alagamento a diminuição de proteínas solúveis totais nas raízes e nas folhas (Figura 5 D) podem estar envolvidas pela diminuição da respiração, logo diminuindo a formação de ATP, diminuição do metabolismo do nitrogênio e pela redução de fotoassimilados para a respiração celular. Com isso as plantas sensíveis a hipóxia entram em autodegradação para se manterem vivas, só que entram em colapso e morte.

6.5- Concentrações de Amido, Sacarose e Carboidratos Solúveis Totais

Os níveis de amido na folha apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, sendo obtidos os valores de 0,8; 0,3 e 0,2 mmol GLU. g⁻¹ de resíduo, nas plantas controle, induzida ao déficit hídrico e alagamento, respectivamente. Estes resultados revelaram quedas de 62,5 e 75 % nos tratamentos déficit hídrico e alagamento, respectivamente, se comparado ao controle. Por outro lado, nas raízes foram obtidos os valores de 0,6; 0,14 e 0,02 mmol GLU. g⁻¹ de resíduo, respectivamente, que corresponde a reduções de 76,7 e 96,7 % nas plantas sob deficiência hídrica e alagamento, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 6 A).

Em relação aos níveis de sacarose da folha nos tratamentos sob restrição hídrica e excesso de água foram observados acúmulo de 40,6 % e redução de 81,7 %, respectivamente, se comparados as plantas controle. Esses resultados se devem aos valores observados de 17,51; 24,63 e 3,21 nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento de, respectivamente. Nas raízes os resultados observados foram de 8,23; 14,53 E 1,23 mg sacarose g⁻¹ MS nas plantas controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente, sendo este comportamento nas raízes semelhante ao descrito nas folhas, com aumento de 76,5 e redução de 85 % nos tratamentos sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente, em relação ao controle (Figura 6 B).

As concentrações de carboidratos solúveis totais variaram significativamente entre os tratamentos, sendo observado nas folhas aumento de 45,4 e redução de 63,6 % nas plantas sob deficiência hídrica e alagamento, respectivamente, comparando com o tratamento controle. Estes resultados se devem aos valores de 2,2; 3,2 e 0,8 mmol GLU. g⁻¹ de resíduo observados nas plantas controle, sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente. (Figura 6 C) Nas raízes os resultados obtidos foram de 1,4; 2,6 e 0,3 mmol GLU. g⁻¹ de resíduo nos tratamentos

controle, déficit hídrico e excesso hídrico, revelando o acréscimo de 85,7 e queda de 78,6 % submetidas ao déficit hídrico e alagamento, respectivamente, quando comparado ao controle.

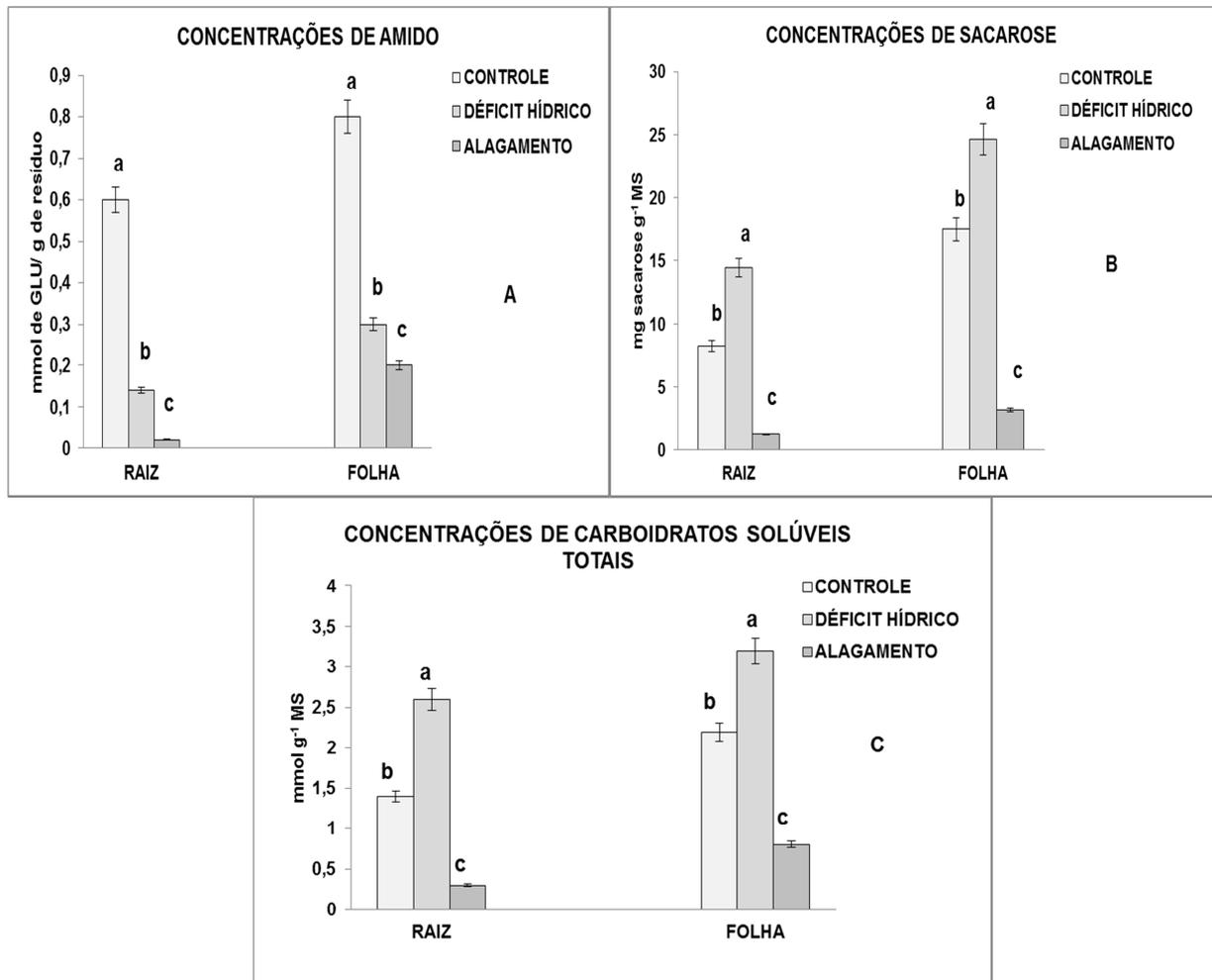


Figura 6. Concentrações de Amido (A), Sacarose (B) e Carboidratos Solúveis Totais (C) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. **As barras representam os desvios padrões das médias.

A redução na concentração de amido nas raízes (Figura 6 A) parece estar relacionada à diminuição do fluxo de fotoassimilados das folhas para as raízes, devido à deficiência hídrica promover uma redução no potencial de pressão positiva no floema, além disso, o provável aumento do consumo de energia (ATP) nas raízes através da respiração celular impulsionada pelo processo de absorção de nutrientes, metabolismo do nitrogênio e crescimento radicular, inibe qualquer possibilidade de armazenamento de reserva de açúcares no sistema radicular. Situação relatada por Pimentel, (2004).

A redução das concentrações de amido nas folhas sob a deficiência hídrica (Figura 6 A) está relacionada à diminuição da fotossíntese e a degradação do amido através das enzimas α e β -amilase, formando novos açúcares como a sacarose, aumentando assim a concentração de

sacarose (Figura 6 B), com intuito de ajuste osmótico, transporte para outros drenos preferenciais e a inativação da enzima chave na síntese de amido que é a ADP-glicose pirofosforilase. Oliveira Neto *et. al* (2009 b) trabalhando com *Sorgum bicolor* submetido a restrição hídrica encontrou resultados semelhantes com os descritos neste estudo.

Em plantas sob alagamento, uma das primeiras respostas fisiológicas observadas é o fechamento estomático (Figura 2 C), que proporcionará uma possibilidade de sobrevivência devido reduzir a demanda de água e nutrientes, porém vários estudos têm mostrado que o alagamento do solo é normalmente capaz de diminuir, de forma significativa, a capacidade fotossintética em plantas intolerantes a esse estresse, sendo o fechamento estomático a principal causa da queda na capacidade fotossintética das plantas sob alagamento. O aumento nos teores de sacarose nas plantas sob déficit hídrico (Figura 6 B) se deve a diminuição da fotossíntese e a conversão de amido em açúcares (Figura 6 A), tais açúcares podem ser transformados em sacarose, sendo a sacarose o principal açúcar formado pelas plantas.

Com a hidrólise da sacarose há liberação de hexoses que serão utilizadas nos processos de ajustamento osmótico, pois as moléculas de água na folha se ligam a elas com a finalidade de manter o nível de água da folha e induzir um ajustamento osmótico na planta. Provavelmente por essa razão que os teores de sacarose aumentaram nas plantas sob déficit hídrico (Figura 6 B). Já as plantas sob alagamento tiveram uma redução nos teores de sacarose (Figura 6 B), mostrando que o alagamento do solo causa redução na taxa de translocação de carboidratos das folhas para as raízes e a diminuição do crescimento e das atividades metabólicas das raízes, que, por sua vez, passam a demandar por menos carboidratos. Segundo Van Handel (1968), a utilização anaeróbica dos açúcares traz como consequência o acúmulo de produtos tóxicos, tais como o etanol. Nas espécies sensíveis, o acúmulo de etanol pode causar morte das células das raízes, o que parece ter ocorrido neste trabalho. Pesquisas conduzida por Lobato *et. al.* (2008) mostraram comportamento semelhante com o obtido neste trabalho ligado ao aumento no nível de sacarose em plantas de *Glycine max* conduzida a seca.

Quanto a concentração de carboidratos, nas plantas sob déficit hídrico (Figura 6 C) foi observado um aumento significativo em relação às plantas controle, este aumento ocorreu provavelmente devido ao processo de ajustamento osmótico no metabolismo dessas plantas, sendo assim, reduzindo seus potenciais osmóticos e, pelas diferenças de gradientes de concentrações manteve-se a turgescência e conseqüentemente retardou a desidratação nos tecidos das plantas.

O aumento observado em plantas sob déficit hídrico está associado ao fato de que com a desidratação, ocorre diminuição do conteúdo de amido na célula (Figura 6 A). Contudo o aumento nas concentrações de açúcares solúveis totais pode estar relacionada com a proteção da biomembrana que pode ser degradada com a falta de água no citosol e pelo aumento de substâncias iônicas, tornando várias enzimas inativas no citosol. Dados também relatados por Lacher; (2000).

A diminuição na concentração de amido (Figura 6 A) demonstra que está ocorrendo um aumento da atividade das enzimas α e β -amilase, que produz acúmulo de sacarose (Figura 6 B) conseqüentemente aumentando a concentração de carboidratos solúveis totais como resposta a tolerância ao déficit hídrico (Figura 6 C). Já nas plantas sob alagamento houve uma diminuição considerável na concentração de carboidratos (Figura 6 C). O que pode estar relacionado com a diminuição da atividade fotossintética da planta, gerando uma queda nos teores de amido (Figura 6 A), conseqüentemente uma queda nos teores de sacarose (Figura 6 B) e carboidratos (Figura 6 C), exaurindo a planta levando por fim ao colapso e a morte.

6.6- Atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase

A atividade da Álcool Desidrogenase variou significativamente entre os tratamentos, sendo nas folhas observados os valores de 0,31; 0,20 e 0,60 moles de NADH H^+ Kg^{-1} de proteína min^{-1} nos tratamentos controle, sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente (Figura 7 A). Estes resultados indicam redução de 35,5 e aumento de 93,5 % nos tratamentos sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente, comparando com o controle. Nas raízes foram obtidos valores de 0,8; 0,2 e 1,1 moles de NADH H^+ Kg^{-1} de proteína min^{-1} nas plantas controle, sob deficiência hídrica e no alagamento, respectivamente. Adicionalmente, na raiz ocorreu a redução de 75 e aumento de 37,5 % nas plantas sob deficiência hídrica e alagamento, respectivamente, quando comparado ao controle.

Na atividade da Lactato Desidrogenase ocorreu variação significativa entre os tratamentos, tanto nas raízes quanto nas folhas. Em relação as folhas foram observados os valores de 0,60; 0,25 e 1,1 moles de NADH H^+ Kg^{-1} de proteína min^{-1} no controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente. Com as plantas sob deficiência hídrica e alagamento apresentando redução de 58,3 e acréscimo de 83,3 %, respectivamente, quando foi comparado com o controle. Nas raízes foram observados diminuição de 60 % e aumento de 140 % nos tratamentos sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente (Figura 7 B), comparando com o tratamento controle. Tais resultados são provenientes dos valores de 0,5; 0,2 e 1,2 moles de

NADH H⁺ Kg⁻¹ de proteína min⁻¹ obtidos nos tratamentos controle, sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente.

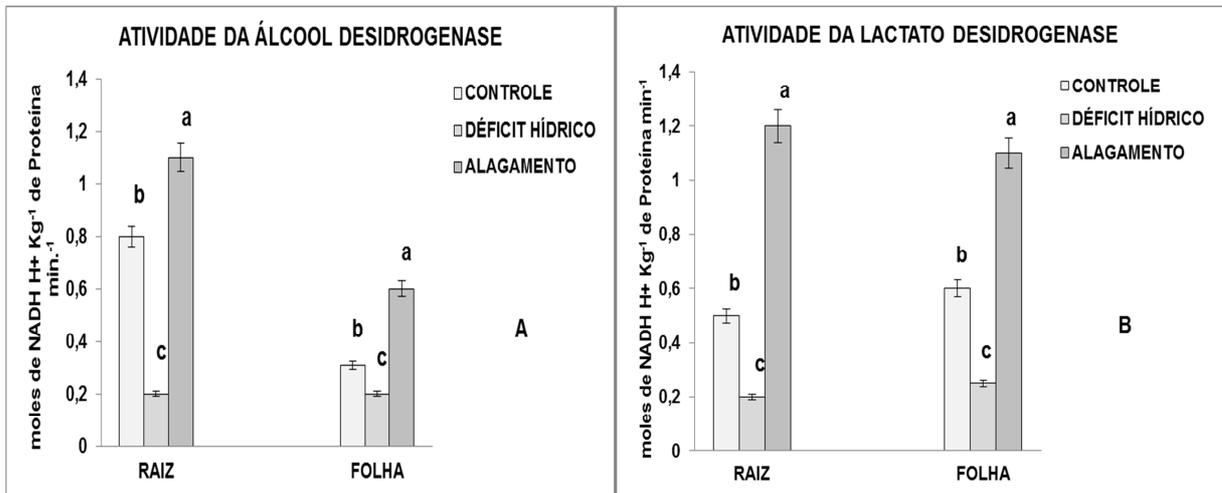


Figura 7. Atividade da Álcool Desidrogenase (A) e Lactato Desidrogenase (B) em plantas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias

A hipóxia causa a paralisação no transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa do mitocôndrio, o ciclo do ácido tricarboxílico não pode operar e o ATP só podendo ser reduzido apenas por mecanismo de fermentação. Sendo assim a hipóxia promove a fermentação do piruvato a lactato através do aumento da ativação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Figura 7 B). A outra enzima envolvida no processo de hipóxia é a álcool desidrogenase (ADH) devido a inibição da LDH por causa da redução de pH intracelular, assim ativando a piruvato descarboxilase.

Os resultados mostraram que houve um aumento na atividade enzimática quando as plantas foram submetidas ao alagamento e diminuição quando submetidas ao déficit hídrico (Figura 7 A e 7 B). Esse resultado provavelmente se deva as plantas que somente conseguirem sobreviver à hipóxia caso consigam manter a produção de ATP e reciclagem do poder redutor. Segundo Moraes *et. al.* (2001) essa adaptação metabólica com relação aos aumentos na taxa de fermentação é em função de incrementos na atividade das enzimas ADH (Figura 7 A) e LDH (Figura 7 B). Neste experimento foi encontrado que para as espécies intolerantes a hipóxia, a atividade dessas duas enzimas nas folhas e raízes em condições de hipóxia apresentaram-se maior, comparada com àquela verificada quando as plantas foram submetidas à aeração normal.

Vários processos metabólicos são afetados pela deficiência de O₂, porém os parâmetros mais estudados são aqueles relacionados à respiração e ao metabolismo de N. Na ausência de

um acceptor eletrônico terminal na cadeia de transporte de elétrons, o ciclo do ácido tricarbóxico passa a funcionar parcialmente e em ambas as direções. Ocorre à acidificação do citosol e o piruvato, produto da glicólise, é transformado em etanol e lactato (Figura 7 A e 7 B), que representam as principais reações fermentativas das plantas. Dados também relatados por Sousa & Sodek (2002).

Estudos conduzidos por Moraes *et. al.* (2001) apresentaram comportamentos semelhantes com o obtido neste trabalho ligado ao aumento na atividade da enzima ADH e LDH em plantas de *Melinis minutiflora* conduzidas sob alagamento e a despeito de inúmeras informações envolvendo ADH e LDH, não existem evidências concretas na literatura de que a atividade dessas enzimas seja limitante para a sobrevivência das plantas sob hipoxia (MORAES, *et. al.* 2001).

6.7- Teores de Pigmentos Fotossintéticos

Os Teores de Clorofila *a*, *b*, total e Carotenóides foram afetados tanto nas plantas sob alagamento como nas plantas sob déficit hídrico, quando comparadas com as plantas controle (Figura 8).

Os Teores de Clorofila *a* variaram significativamente entre os tratamentos, apresentando os valores 2,9; 1,2 e 0,5 mmol Kg⁻¹ MF nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente. No qual as plantas sob alagamento tendo um decréscimo de 82,7 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 58,6 %, em relação às plantas controle (Figura 8).

Nos Teores de Clorofila *b* ocorreu variação significativa entre os tratamentos, sendo observados os teores de 1,8; 0,6 e 0,3 mmol Kg⁻¹ MF, nas plantas controle, sob déficit hídrico e alagamento, respectivamente. As plantas sob alagamento apresentando um decréscimo de 83,3 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 66,7 % em relação às plantas controle (Figura 8).

Os Teores de Clorofila total variaram significativamente entre os tratamentos, sendo as plantas sob alagamento tendo um decréscimo de 83 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 61,7 % em relação às plantas controle (Figura 8). Tais resultados são provenientes dos teores de 4,7; 1,8 e 0,8 mmol Kg⁻¹ MF provenientes dos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente.

Os Teores de Carotenóides apresentaram 2,4; 1,3 e 0,4 mmol Kg⁻¹ MF nos tratamentos controle, sob seca e alagamento, respectivamente. As plantas sob alagamento tendo um

decréscimo de 83,3 % em relação às plantas controle e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 45,8 % em relação às plantas controle (Figura 8).

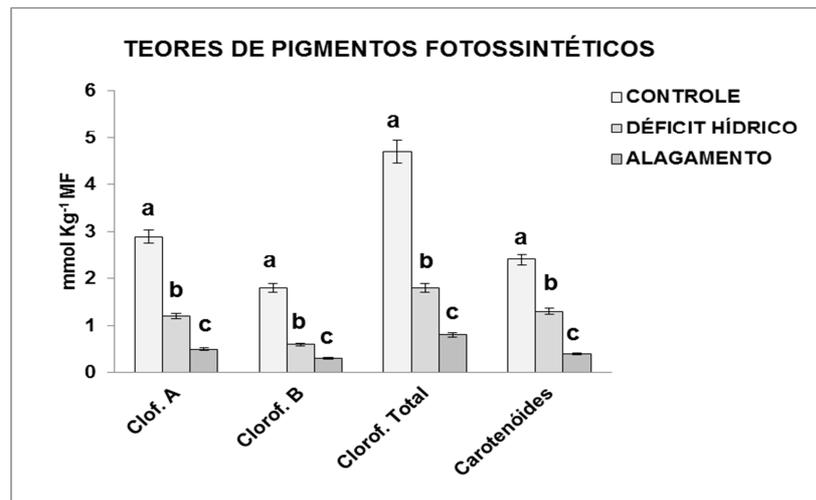


Figura 8. Teores de Clorofila *a*, *b*, total e Carotenóides em plantas de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias

A degradação dos pigmentos clorofilianos está relacionada com a degradação dos carotenóides, pois os carotenóides são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no processo de fotoxidação. O déficit hídrico induz a degradação do β -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, produzindo diminuição no teor de carotenóides (Figura 8), pigmentos aparentemente envolvidos na proteção contra a fotoinibição.

A degradação da clorofila *a* ocorre paralelamente com a manutenção ou com aumentos na concentração de carotenóides totais, então uma contínua dissipação de excessos de energia é esperada. Este fato deve-se a desordens metabólicas na planta, diminuindo a eficiência na utilização de carbono e aumentando a produção de etanol e lactato (Figura 7), causando um desbalanço e decréscimo na formação das clorofilas e carotenoides. Resultados também reportados por Piekielek & Fox, (1992). Os resultados obtidos nesta pesquisa durante o déficit hídrico são similares com os observados por Lobato *et. al* (2009 b) investigando plantas de *Capsicum annuum* sob restrição hídrica e a queda observada nos níveis de carotenóides no tratamento sob déficit hídrico e corroborada pela investigação feita por Lobato *et. al* (2009 a) trabalhando com plantas *Sorgum bicolor* sob estresse salino.

Nas plantas sob alagamento houve uma diminuição nos teores de clorofilas e carotenóides (Figura 8). A submersão das plantas por longos períodos de tempo afeta o

aparato fotossintético e fotoquímico, reduz o crescimento de folhas, caule e raízes, podendo resultar na morte das plantas. Outro fator é a diminuição do metabolismo do sistema radicular e conseqüentemente o acúmulo de metabólitos e radicais tóxicos sobre os sistemas membranares dos cloroplastídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Huang *et al.* (1994).

A diminuição nos teores de carotenóides nas plantas sob alagamento (Figura 8) subsidia a hipótese levantada sobre a baixa concentração de ABA (Figura 2 D) que está ligada a deficiência na formação de carotenóides, devido a biossíntese do ABA estar dividida em 3 (três) etapas: 1- síntese dos carotenóides não oxigenados nos plastídeos; 2- síntese e clivagem dos carotenóides oxigenados (xantofilas) nos plastídeos; 3- síntese do ABA no citossol.

O alagamento reduz a condutância estomática (Figura 2 C) e provoca clorose nas folhas, diminuindo, portanto, a aquisição de carbono por meio da fotossíntese e conseqüentemente a degradação dos pigmentos fotossintéticos (Figura 8). Outro fator que está ligado à diminuição dos teores de clorofila tanto sob déficit hídrico quanto sob alagamento é a redução da concentração de nitrato (Figura 3 A) e conseqüentemente a redução da atividade da redutase do nitrato (Figura 3 B), pois a rota de assimilação do Nitrogênio gera o precursor da clorofila que é o δ -aminolevulinato.

6.8- Altura da Planta, Diâmetro do Caule, Número de Folhas e Área Foliar

Em relação à altura das plantas, ocorreu diferença significativa entre as plantas sob alagamento e as plantas controle que apresentaram 49,0 e 58,0 cm, respectivamente, caracterizando um acréscimo de 15,5 % em relação às plantas controle, já as plantas sob déficit hídrico (52 cm) não diferiram estatisticamente das plantas controle (Figura 9 A).

As plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram diâmetro do caule de 0,50; 0,46 e 0,48 cm, respectivamente, não diferindo estatisticamente (Figura 9 B).

O número de folhas variou significativamente entre os tratamentos, sendo as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico com 52, 29 e 38 folhas, respectivamente, caracterizando um decréscimo de 39 % nas plantas sob alagamento e de 23,7 % nas plantas sob déficit hídrico. (Figura 9 C).

Em relação à área foliar ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, sendo que as plantas controle, sob alagamento e sob déficit hídrico apresentaram 203,1; 92,4 e 140,3 mm², respectivamente, caracterizando um decréscimo de 54,5 % nas plantas sob alagamento e

30,0 % nas plantas sob déficit hídrico quando comparadas com as plantas controle (Figura 9 D).

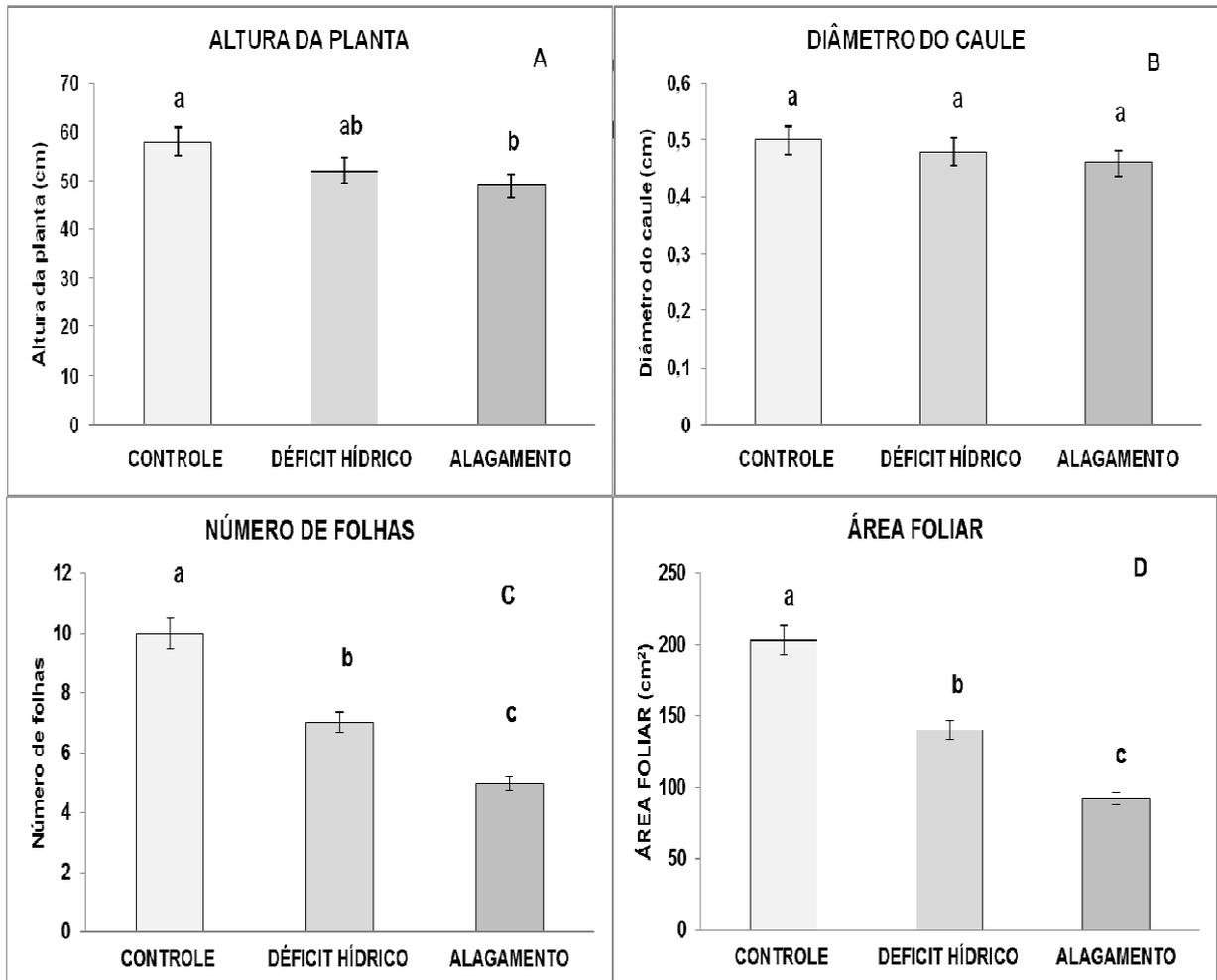


Figura 9. Altura da Planta (A), Diâmetro do Caule (B), Número de folhas (C) e Área Foliar (D) em plantas de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa,2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias.

Nas plantas sob alagamento ocorreu uma diminuição do crescimento (Figura 9 A) quando comparado ao controle, o qual foi considerado uma resposta à redução no consumo de energia, ocasionado pela restrição de gases na parte subterrânea, enquanto que a altura das plantas controle manteve um aumento contínuo durante o experimento (Figura 9 A). Já as plantas sobre déficit hídrico tiveram uma pequena diminuição no seu crescimento, sem variarem estatisticamente quando comparadas com as plantas controle (Figura 9 A).

O diâmetro do caule não teve diferença significativa entre os tratamentos, contudo os tratamentos não influenciaram no diâmetro do caule no decorrer do experimento (Figura 9 B). Os resultados obtidos nesta pesquisa sobre o diâmetro do caule durante o alagamento são

similares com os observados por Batista *et. al* (2008) investigando plantas de *Cecropia pachystachya* sob alagamento.

O número de folhas das plantas sob alagamento apresentou uma diminuição em comparação com as plantas controle (Figura 9 B), uma das principais conseqüências do excesso de água no solo é o déficit de oxigênio ou a completa ausência dele. As respostas de espécies sensíveis ao estresse resultante da inundação, geralmente expressam os distúrbios causados pela hipoxia ou anoxia nas raízes. As mais comuns são a abscisão e clorose de folhas, redução no comprimento da raiz principal, redução no crescimento em altura, inibição da formação de primórdios foliares, redução na expansão foliar e até mesmo morte da planta. Além disso, ocorre também o desenvolvimento de raízes adventícias que podem facilitar a difusão de oxigênio e a eliminação de produtos voláteis potencialmente tóxicos, muitas vezes acumulados durante a hipóxia. Resultados semelhantes observados por Lizaso *et al.*, (2001).

Segundo Kozlowski (1995), plantas sobre déficit hídrico diminuem o número de folhas como uma maneira de sobrevivência, assim evitando a perda de água por transpiração. Já Taiz & Zeiger (2004) fala que a queda no número de folhas é devida há síntese acentuada e maior sensibilidade ao etileno ocasionando a abscisão foliar. O ABA atua na redução da parte aérea e crescimento radicular (Figura 2 D), para evitar a perda excessiva de água por transpiração nas folhas bem como buscar novas fontes de água pelo sistema radicular, conseqüentemente ocorre uma diminuição na área foliar (Figura 9 D). Isto foi devido ao aumento nas concentrações de ABA nas plantas sob déficit hídrico (Figura 2 D). Resultados corroborados por Liu & Baird (2003).

Com a diminuição do potencial hídrico (Figura 2 A) ocorre à diminuição da condutância estomática (Figura 2 C), diminuição da transpiração (Figura 2 B) e aumento nas concentrações de ABA (Figura 2 D), resultando na redução da área foliar das plantas submetidas ao déficit hídrico em relação às plantas controle (Figura 9 D), e que levam a uma redução da área pela perda de água pela transpiração mediante o suprimento limitado de água pelo solo. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza & Amorim (2009) trabalhando com *Physalis angulata*.

Nas plantas submetidas ao alagamento (Figura 9 D) foram observados sintomas de clorose nas folhas maduras, decréscimo na formação de folhas, senescência foliar, que segundo Vartapetian & Jackson (1997), são sintomas claros de estresse por hipoxia, que com o passar do tempo se intensifica passando para anoxia e levando a planta a morte. Os resultados obtidos nesta pesquisa durante o alagamento estão de acordo com os observados por Batista *et. al* (2008) investigando plantas de *Cecropia pachystachya* sob alagamento.

6.9- Massa Seca da Parte Aérea, Massa Seca da Raiz, Razão Parte Aérea/Raiz e Massa Seca Total

A Massa Seca da Parte Aérea, Massa Seca da Raiz, Razão Parte Aérea/Raiz e Massa Seca Total foram afetadas tanto nas plantas sob alagamento como nas plantas sob déficit hídrico, quando comparadas com as plantas controle (Figura 10).

Na Massa Seca da Parte Aérea foram obtidos os valores de 45, 32 e 21 g nos tratamentos controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente. Caracterizando uma diminuição significativa. As plantas sob alagamento tendo um decréscimo de 153,3 % em relação às plantas controle, e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 28,9 % quando comparadas com as plantas controle (Figura 10 A).

A Massa Seca da Raiz variou significativamente entre os tratamentos, nas plantas sob alagamento tendo um decréscimo de 478,6 % em relação às plantas controle, já as plantas sob déficit hídrico tiveram um acréscimo de 21 % quando comparadas com as plantas controle (Figura 10 B). Tais resultados são provenientes das massas de 24,3; 29,4 e 5,2 g nos tratamentos controle, seca e alagamento, respectivamente.

A Razão Parte Aérea/Raiz variou significativamente entre os tratamentos e apresentaram as relações de 1,84; 1,08 e 4,05 nas plantas controle, déficit hídrico e alagamento, respectivamente. As plantas sob alagamento tiveram um acréscimo de 120,1 % em relação às plantas controle, já as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 41,3 % em relação às plantas controle (Figura 10 C).

A Massa Seca Total variou significativamente entre os tratamentos, com as plantas controle, sob déficit hídrico e alagamento apresentando 69,3; 61,4 e 26,2 g, respectivamente. O tratamento alagamento teve um decréscimo de 62,2 % em relação às plantas controle, e as plantas sob déficit hídrico tiveram um decréscimo de 11,4 % em relação às plantas controle (Figura 10 D).

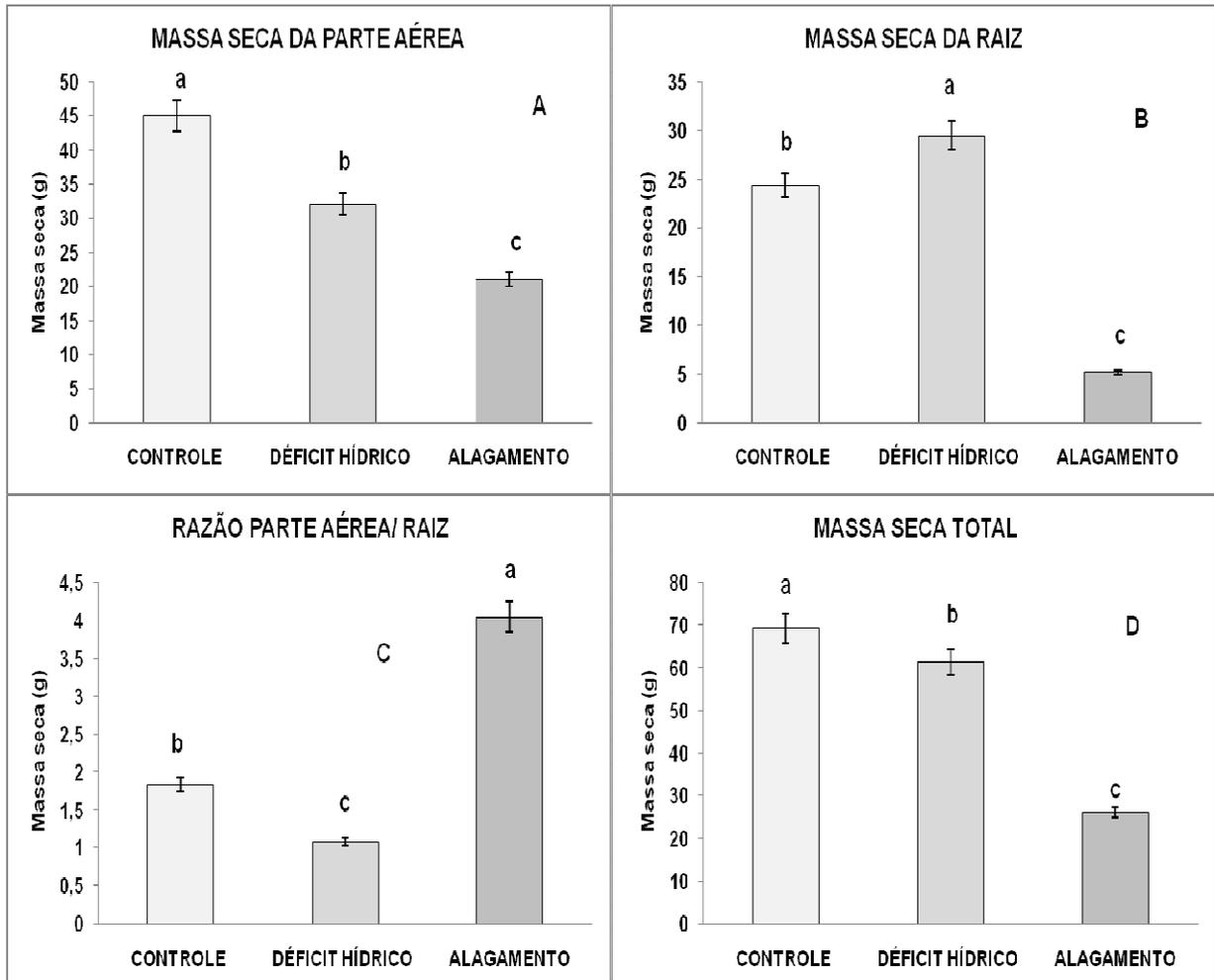


Figura 10. Massa Seca da Parte Aérea (A), Massa Seca da Raiz (B), Razão Parte Aérea/Raiz (C) e Massa Seca Total (D) em plantas de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) submetidas durante nove dias sob déficit hídrico e alagamento. Belém-Pa, 2009.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**As barras representam os desvios padrões das médias

As plantas de Ipê-Amarelo sob alagamento apresentaram maior inibição com relação ao crescimento da parte aérea (Figura 9 A) e conseqüentemente diminuição da massa seca durante todo o experimento (Figura 10 A). Tal inibição pode ser explicada pelo estresse gerado pela inundação que acarreta a diminuição ou falta de O_2 , situações conhecidas por hipóxia e anóxia respectivamente, acúmulo de substâncias tóxicas e conseqüente diminuição da absorção de nutrientes. Foram observados também os fenômenos de senescência e abscisão foliar e necrose do tecido foliar nos últimos dias do experimento, conforme observado na Figura 10 e que estão de acordo com Glinski & Stepniewski (1986), a redução de O_2 no solo promove o aparecimento de distúrbios funcionais em toda a planta explicando assim a necrose do tecido foliar. Já as plantas sob déficit hídrico tiveram redução da massa seca da parte aérea em relação ao controle (Figura 9 A) e tal diminuição se deve a diminuição da taxa fotossintética da planta e o metabolismo do nitrogênio, conseqüentemente diminuição de todo o ciclo metabólico da planta.

A diminuição da massa seca da raiz (Figura 10 B) mostra não só uma paralisação no crescimento radicular como uma diminuição no mesmo provocado pela sua necrose e morte, em plantas sob alagamento. Já plantas sob déficit hídrico foi observado um aumento no sistema radicular em comparação com o controle (Figura 10 B), indicando assim um mecanismo de defesa da planta há falta de água no solo, fazendo com que seu sistema radicular se expanda para procurar fontes de água em profundidades mais baixas a fim de sanar o déficit hídrico. Segundo Taiz & Zeiger (2004), o crescimento do sistema radicular é considerado uma segunda linha de defesa contra o déficit hídrico, que promove o crescimento preferencial das raízes em direção a zonas do solo que permanecem úmidas, com isso há a proliferação de raízes mais profundas, conseqüentemente aumentando o sistema radicular. Os resultados obtidos neste estudo ligados ao déficit hídrico e a massa seca da raiz são similares com os encontrados por Younis *et al.* (2000) investigando três cultivares de *Sorghum bicolor* induzida ao estresse hídrico.

Em solo drenado as raízes obtêm oxigênio para a respiração aeróbica diretamente do espaço gasoso do solo, uma vez que os poros preenchidos de gás permitem a difusão do O₂ para as partes mais profundas do solo. Entretanto em solos inundados ou pobremente drenados, a água preenche os poros do solo bloqueando assim a difusão do O₂ (TAIZ & ZEIGER, 2004). A aeração inadequada no solo leva a uma rápida depressão de oxigênio (KOZLOWSKI, 1984), com a falta de oxigênio os processos aeróbicos são substituídos por anaeróbicos levando ao acúmulo de gases (JACKSON & DREW, 1984; PONNAMPERUMA, 1984) no solo, os quais se alojam nas bases dos caules e raízes (CRAWFORD, 1989).

Segundo Jackson (1985) o estresse experimentado pelas raízes sob inundaçãointensifica-se com o tempo, com a passagem da condição de hipóxia para anóxia e pela ação de toxinas produzidas por bactérias anaeróbicas do solo. Anóxia e toxinas podem matar as raízes, principalmente pelo excesso de Fe e Mn e pelo acúmulo de substâncias fitotóxicas como dióxido de carbono e etileno (RODRIGUES *et al.*, 1993). Sendo assim, a redução de O₂ no solo promove o aparecimento de distúrbios funcionais em toda a planta afetando principalmente a absorção de água e de nutrientes pelas raízes (GLINSKI & STEPNIEWSKI, 1986).

Em resposta à redução de O₂ e à concentração de gases tóxicos no solo, a planta apresenta alguns sintomas como murchamento, clorose das folhas, hipertrofia do caule, alterações morfo-anatômicas, diminuição do crescimento e produtividade, e morte da raiz (KRAMER, 1983), explicando assim a drástica diminuição da massa seca da raiz (Figura 10

B) uma vez quase todo o sistema radicular se encontrava necrosado, o que levou a planta a morte após nove dias de alagamento.

Com isso tanto o déficit hídrico como o alagamento tiveram impacto negativo no acúmulo de biomassa total durante o experimento, sendo o alagamento o que mais influenciou negativamente no desenvolvimento da planta, afetando a massa seca da parte aérea (Figura 10 A), massa seca da raiz (Figura 10 B), razão parte aere/raiz (Figura 10 C) e massa seca total (Figura 10 D). Husaini & Abdin (2008) estudando plantas de *Fragaria x ananassa* submetidas ao estresse salino apresentara resultados semelhantes sobre a diminuição da massa seca total, corroborando os resultados obtidos nesse estudo.

6.10- Sintomatologia do Experimento.

Após três dias sob alagamento os primeiros sintomas começam a parecer, sendo pontuações cloróticas nas folhas conforme observado na figura 11. Consequentemente, este sintoma pode estar associado ao abalo no metabolismo do nitrogênio e a degradação dos pigmentos fotossintéticos, durante o alagamento (Figura 8).



Figura 11. Planta de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) com quatro dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009.

Com cinco dias as pontuações cloróticas evoluem para clorose internerval nas folhas, observado na figura 12, intensificando as alterações observadas e descritas neste estudo ligado ao metabolismo do nitrogênio e degradação dos pigmentos fotossintéticos.



Figura 12. Planta de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) com cinco dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009

Com oito dias sob alagamento os sintomas de anoxia já estão bastante evidentes, tal como a queda do potencial hídrico (Figura 2 A), alteração no mecanismo estomático e conseqüente redução da condutância estomática (Figura 2 C) e também na transpiração (Figura 2 B). Portanto, as alterações das relações hídricas das plantas sob alagamento promovem conseqüências sobre o metabolismo do nitrogênio, tal como redução na absorção de nitrato (Figura 3 A), diminuindo a atividade da redutase do nitrato (Figura 3 B) e conseqüentemente a queda nas concentrações de amônio livre (Figura 4 A), que vai interferir na atividade da glutamina sintetase (GS) (Figura 4 B), e diminuir as concentrações de Prolina (Figura 5 A), Glicina-Betaína (Figura 5 B) e Aminoácidos Solúveis Totais (Figura 5 C), além de redução nas concentrações de Proteínas Solúveis Totais (Figura 5 D). As alterações nas relações hídricas da planta sob alagamento promovem modificações no metabolismo do carbono, como queda nas concentrações de Amido (Figura 6 A), diminuição nas concentrações de Sacarose (Figura 6 B) e Carboidratos Solúveis Totais (Figura 6 C). O alagamento no Ipê-Amarelo promove a degradação e conseqüentemente redução dos pigmentos fotossintéticos (Figura 8). Em resposta ao alagamento e conseqüente situação de

anoxia em que as plantas foram expostas, ocorreu o aumento nas atividades da Álcool Desidrogenase (Figura 7 A) e Lactato Desidrogenase (Figura 7 B).

As alterações bioquímicas observadas nesse estudo, podem estar relacionadas as alterações morfológicas, tal como a paralisação no crescimento da parte aérea (Figura 9 A), senescência e abscisão foliar (Figura 9 C e 9 D), epinastia e necrose do tecido nos últimos dias do experimento (Figura 13 e 14). Adicionalmente, a necrose do sistema radicular ocorreu devido à fermentação durante a anoxia (Figura 10 B).



Figura 13. Planta de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) com oito dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009



Figura 14. Planta de Ipê- amarelo (*Tabebuia serratifolia*) com nove dias sob alagamento. Belém-Pa, 2009

7- CONCLUSÃO

O alagamento e o déficit hídrico por nove dias promoveram mudanças a nível bioquímico, fisiológico e morfológico em plantas de Ipê-Amarelo. Sobre os compostos nitrogenados das plantas sob alagamento, foi observado efeito intenso e altamente prejudicial, enquanto que na situação de déficit hídrico as alterações sobre o metabolismo do carbono e do nitrogênio estão relacionadas com o ajuste dos compostos osmolíticos, visando a sobrevivência da planta em ambiente com baixa disponibilidade hídrica. Nos pigmentos fotossintéticos ambas as condições estudadas resultaram em degradação e conseqüente queda nos teores de clorofilas e carotenóides. Portanto, este estudo revela que as plantas jovens de Ipê-Amarelo são altamente sensíveis ao alagamento e promoveram ajustamento osmótico ao estresse hídrico.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIA, J. M.; MOHANTY, P.; MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. **Amino Acids**, n. 21, p. 195–200, 2001.
- ARMSTRONG, W., BRÄNDLE, R. & JACKSON, M.B.; Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Bot. Neerl.** 43:307-358. 1994
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L.A.C.J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.313-339, 2008.
- BATES, L. S., Waldren, R. P. e Teare, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. **Plant and Soil**. V. 39: 205-207. 1973
- BATISTA, C. U. N.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C. & PIMENTA, J. A.; **Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos.** Acta botanica brasileira 22(1): 91-98. 2008
- BIONDI, D.; REISSMANN, C.B. Análise da composição foliar do ipê-amarelo (*Tabebuia chryso-tricha* (Mart) Standl) na arborização urbana de Curitiba,PR. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.12, n.2, p.153-159, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** V. 72: 248-254.1976.
- BRAILSFORD, R.W., VOESENEK, L.A.C.J., BLOOM, C.W.P.M., SMITH, A.R., HALL, M.A. & JACKSON, M.B; Enhanced ethylene production by primary roots of *Zea mays* L. in response to sub-ambient partial pressures of oxygen. **Plant Cell & Env.** 16:1071-1080, 1993.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: GRUISSEM, W.; BUCHANNAN, B.; JONES, R. (Eds.) Responses to Abiotic Stresses. Rockville, MD: **American Society of Plant Physiologists**, p.1158-1249, 2000.
- CATALDO, D. A.; HAROON, S. L. E & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commum Soil Science Plant Analyse**, 6: (1):71-80, 1975.
- CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30 p. 239–264, 2003.
- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for watersaving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2365–2384, 2004.
- CHENNA, P. H.; DOCTOROVICH, V.; BAGGIO, R. F.; GARLAND, M. T.; BURTON, G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivatives of â-Lapachone. **Journal Medical Chemistry**, [S.l.], v. 44, p. 2486-2489, 2001.
- CRAWFORD, R. M. M.; Studies in plant survival. Blackwell Scientific Publications. 1989.

DA MATTA, F.M. et al. Water relations of coffee leaves (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in response to drought. **Journal of Horticultural Science**, v.68, n.5, p.741-746, 1993.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215-223, 1993.

DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. **The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis**. v. 1. Amsterdam: Elsevier, 21–26. 1996.

DREW, M.C., He, C., & MORGAN, P.W.; Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends Plant Sci.** 5:123-127. 2000.

DREW, M.C., Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 48:223-250. 1997.

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

DURING, H. Photochemical and non-photochemical responses of glasshouse-grown grape to combined light and water stress. **Vitis, Siebeldingen**, v. 37, n. 1, p. 1-4, 1998.

FERERES, E.; GOLDHAMER, D. A. Suitability of stem diameter variations and water potential as indicators for irrigation scheduling of almond trees. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, p. 139–144, 2003.

FERREIRA, L.; CHALUB, D.; MUXFELDT, R. Ipê-amarelo: *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. **Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia**, Manaus, v. 5, 2004.

FERREIRA, V. M. ; MAGALHÃES, P. C. ; DURÃES, F. O. M. ; OLIVEIRA, L. E. M. ; PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado a deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.13-17, 2002.

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

FOYER, C.H.; VALADIER, M-H.; MIGGE, A.; BECKER, T.W. Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. **Plant Physiol.**, 117:283-292, 1998.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J.; Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **TRENDS in Plant Science**, v.9, p. 449-456, 2004.

GLINSKI, J. & STEPNIEWSKI, W.; Soil aeration and its role for plants. Florida: **CRC Press Inc**, pp 228. 1986.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H.; Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. FEALQ, Piracicaba, SP. 309 p. 2002.

GRIEVE C.M.; GRATTAN S. R.. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil** 70: 303-307. 1983.

HADDAD, C. M.; PLATZECK, C. O.; TAMASSIA, L. F. M.; CASTRO, F. G. F.; Estabelecimento do capim setária cv. Kazungula em condições de inundação. **Scientia Agricola** 57: 205-212. 2000.

HAGEMAN, R. H. G. & HUCKLESBY, D. P., Nitrate reductase from higher plants. In: **Methods in enzymology**, 17 A: 491 – 503, 1971.

HARE PD, CRESS WA Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation** 21: 79-102, 1997.

HARTUNG, W.; SAUTER, A.; HOSE, E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 27–32, 2002.

HEILMAN, J. L.; HAM, J. M. Measurement of mass flow rate of sap in *Ligustrum japonicum*. **Hortscience**, v. 25, n. 4, p. 465-467, 1990.

HOFFMAN, N.E.; HANSON, A.D. Purification and properties of hypoxically induced lactatedehydrogenase from barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, n.3, p.664-670, Nov. 1986.

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

HSU, Y., TSENG, M. & LIN, C.; The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40:193-198. 1999.

HUANG, B.; JOHNSON, J. W.; NESMITH, S. e BRIDGES, D. C. Growth, physiological and anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging and nutrient supply. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 45, n. 271, p. 193-202. 1994.

HUSAINI, A.M.; ABDIN, M.Z. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. **Plant Science**, 174: 446-455, 2008.

ITO T, LEVENSTEIN ME, FYODOROV DV, KUTACH AK, KOBAYASHI R, KADONAGA JT; ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. **Genes Dev** 13: 1529–1539, 1999.

JACKSON, M. B. & DREW, M. C.; Effect of flooding on growth and metabolism herbaceous plants. In: Kozlowski TT (Ed) Flooding and plant growth. London: **Academic Press**, pp 47-128. 1984.

- JACKSON, M. B.; Ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto 36:145-174. 1985.
- JALEEL CA, GOPI R, MANIVANNAN P, GOMATHINAYAGAM M, RIADH K, INÈS J, CHANG-XING Z, HONG-BO S AND PANNEERSELVAM R; Antioxidant defense responses: **Physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints**. 2009.
- JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v. 90, p. 301-313, 2002.
- JONES, H. G. Application of thermal imaging and infrared sensing in plant physiology and ecophysiology. **Advances in Botanical Research**, v. 41, p. 107–163, 2007.
- KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE,T.; OJIMA, K. A role for glutamine synthetase in remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiology**. 96, 411-417, 1991.
- KAVI KISHOR, P. B.; HONG, Z.; MIAO, G. H.; HU, C. A. A.; VERMA, D. P. S. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline overproduction and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 1387-1394, 1995.
- KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; 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: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.
- KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452p. 2004.
- KIRKHAM, M. B. Principles of soil and plant water relations. Burlington, MA: Elsevier **Academic Press**. 2004.
- KOZLOWSKI, T. I. Water supply and leaf shedding. In: . Water deficits and plant growth. New York: **Academic Press**,. n.4, p.191-222. 1995.
- KOZLOWSKI, T. T.; Responses of woody plants to flooding. In: KOZLOWSKI, T. T.; (Ed) *Flooding and Plant Growth*. London: **Academic Press**, pp 129-163. 1984
- KRAMER, P. J.; Water relations of plants. New York: Academic Press, pp146-186. 1983.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plant and soils. Academic Press, New York, 1995.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.S.; PONS, T.L.; **Plant Physiological Ecology**. Springer-Verlag, Berlim. 540p. 1998.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 531 p. 2000.

LIAO, C.T.; LIN, C.H.; Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, v. 25, p. 148-157, 2001.

LICHTHENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Colowick SP, Kaplan (ed) **Methods in Enzimology**, v.148. Academic Press, San Diego. p.350-382. 1987.

LIESACK, W., SCHNELL, S. & REVSBECH, N.P.; Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiol. Rev.** 24:625-645. 2000.

LIU, F.; JENSEN, C. R.; SHAHANZARI, A.; ANDERSEN, M. N.; JACOBSEN, S. E.; ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying. **Plant Science** v. 168. pg. 831 – 836, 2005.

LIU X. N. W. V. BAIRD; Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. **Crop Science** 43: 678-687, 2003.

LOBATO, A.K.S. COSTA R.C.L., NETO M.A.M., OLIVEIRA NETO C.F., SANTOS FILHO B.G., ALVES G.A.R., COSTA K.C., SILVA L.I., CONRADO T.V., MALEIA M.P. Consequences of the water deficit on nitrogen compounds in pepper (cv. Vermelho Gigante) plants. **Research Journal of Biological Science** 4 (6): 760-764. 2009a

LOBATO, A.K.S., C.F. OLIVEIRA NETO, B.G. SANTOS FILHO, R.C.L. COSTA, F.J.R. Cruz, H.K.B. Neves and M.J.S. Lopes, Physiological and biochemical behavior in soybean (*Glycine max* cv. Sambaiba) plants under water deficit. **Australian J. Crop Sci.**, 2 (1): 25-32. 2008.

LOBATO, A.K.S.; LUZ, L.M.; COSTA, R.C.L.; TAN, D.K.Y.; BONATO, C.M.; SILVA, M.H.L.; OLIVEIRA NETO, C.F.; SILVA, L.I. Relationship between chlorophyll a and total soluble carbohydrates in pepper submitted to water deficiency. **Journal of Animal & Plant Sciences** 5 (2): 515 - 526. 2009b

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v.2. 4.ed. São Paulo, Nova Odessa. p. 368, 2002.

LUDLOW, M. M.; POWLES, S. B. Effects of photoinhibition induced by water stress on growth and yield of grain sorghum. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 179-194, 1988.

MADAN A, DEHAAN R, MUDRA D, CARROLL K, LECLUYSE E, PARKINSON A; Effect of cryopreservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes. **Drug Metab Dispos** 27:327–335, 1999.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-58, 2005.

MARIN, F. R. **Evapotranspiração, transpiração e balanço de energia em um pomar de lima ácida ‘Tahiti’**. Dissertação (Mestrado) Piracicaba: USP/ESALQ, 74 p., 2000.

- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000.
- MATSUI, T. & TSUCHIYA, T. Root aerobic respiration and growth characteristics of three *Typha* species in response to hypoxia. *Ecological Research* 21: 470-475. 2006.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-668, 2000.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 15–19, 2006.
- MORAES, M.G; ALVES, J.D; OLIVEIRA, L.E.M; VITORINO, P. F. P. G; MAGALHÃES, M.M. Caracterização do crescimento da atividade das desidrogenase alcoólica e láctica em seis espécies herbáceas sob condição de hipoxia. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.1, p. 86-95, jan./fev., 2001.
- MORARD, P. & SILVESTRE, J.; Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: **A review. Plant Soil** 184:243-254. 1996.
- NANJO T, KOBAYASHI M, YOSHIBA Y, KAKUBARI Y, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K; Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett** 461: 205–210, 1999.
- NÚÑEZ, V.; OTERO, R.; BARONA, J.; SALDARRIAGA, M.; OSORIO, R. G.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; DÍAZ, A.; QUINTANA, J. C. Neutralization of the edema-forming, defibrinating and coagulant effects of *Bothrops asper* venom by extracts of plants used by healers in Colombia. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, [S.l.], v. 37, n. 7, p. 969-977, July 2004.
- OLIVEIRA NETO CF, LOBATO AKS, COSTA RCL, MAIA WJMS, SANTOS FILHO BG, ALVES GAR, BRINEZ B, NEVES HKB, LOPES MJS. and CRUZ FJR: Nitrogen compounds and enzyme activities in sorghum induced to water deficit during three stages. **Plant, Soil and Environment** 55: 238-244. 2009a.
- OLIVEIRA NETO CF, LOBATO AKS, GONÇALVES-VIDIGAL MC, COSTA RCL, SANTOS FILHO BG, ALVES GAR, MAIA WJMS, CRUZ FJR, NEVES HKB. and LOPES MJS: Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. **Journal of Food, Agriculture & Environment** 7: 588-593. 2009b.
- PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. **Viveiros florestais**. 2.ed. Viçosa:UFV, 69p. 2000.
- PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1152-1157, 2005.
- PASSIOURA, J. B. Drought and drought tolerance. In: BELHASSEN, E. (Ed.) **Drought tolerance in higher plants**. Kluwer Academic Press: Netherlands, p. 1-7, 1997.

- PELACANI, C.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; SOARES, A.M.; & CRUZ, J.L.C.; Relações hídricas de algumas espécies florestais em substrato inundado. *Revista Árvore*, 19: 548-558. 1995.
- PENG, H., CHAN, C., SHIH, M. & YANG, S.F.; Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. **Plant Physiol.** 126:742-749. 2001.
- PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics**, v. 253, p. 334–341, 1996.
- PEOPLES, M. B., FAIZAH, A. W., REAKASEM, B. E HERRIDGE, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. n Canberra. p. 76. 1989.
- PERATA, P., POZUETA-ROMERO, J., AKAZAWA, T. & YAMAGUCHI, J.; Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. **Planta** 188:611-618. 1992.
- PEZESHKI, S. R., Wetland plant responses to flooding. *Environ. Exp. Bot.* 46: 299-312, 2001
- PIEKIELEK, W. P.; FOX, R. H. Use of a chlorophyll meter to predict sidedress nitrogen requirements for maize. **Agronomy Journal**, 84:59-65, 1992.
- PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. **EDUR**, Seropédica. p.191. 2004.
- PONNAMPERUMA, F. N.; Effects of flooding on soil. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed) *Flooding and Plant Growth*. London: Academic Press, pp 10-43. 1984.
- PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 76, p. 93-98, 2001.
- REITZ, P.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. p.336-349, 1988.
- RICARD, B., COUEÉ, I., RAYMOND, P., SAGLIO, P.H., SAINT-GES, V. & PRADET, A.; Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiol. Biochem.** 32:1-10. 1994.
- RODRIGUES, T. J. D; RODRIGUES, L. R. A.; REIS, R. A.; Adaptação de plantas forrageiras às condições adversas. In: II Simpósio sobre ecossistema de pastagens, Jaboticabal, SP. 1993.
- ROSS MA, CROSLEY LK, BROWN KM, DUTHIE SJ, COLLINS AC, ARTHUR JR & DUTHIE GG. Plasma concentrations of carotenoids and antioxidant vitamins in Scottish males: influences of smoking. **Eur. J. Clin. Nutr.** 49: 861–865, 1995.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's Guid: version 6.12, SAS Institute, Cary, NC. 1996.
- SCHNEIDER, P. S. P.; SCHINEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G.; Crescimento do ipê-roxo, *Tabebuia impetiginosa* Martius ex A.P. de Candolle, na depressão central do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n.2, p.91-100, 2000.

- SHALHEVET, J.; Plants under salt and water stress. In: FOWDEN, L.; MANSFIELD, T.; STODDART, J. Plant adaptation to environmental stress. London: **Chapman & Hall**, cap 7, p.133-54. 1983.
- SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 199–208, 2008.
- SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; VIEGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. & FIGUEIREDO, M. V. B. N- Compound accumulation and carbohydrate shortage on N₂ fixation in drought- stressed and rewatered cowpea plants. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 1 (3), 65-75. 2003.
- SIRIPORNADULSIL, S.; TRAIN, S.; VERMA, D. P. S.; SAYRE, R. T. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. **Plant Cell**, v. 14, p. 2837–2847, 2002.
- SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 83-94, 2002.
- SOUZA, N. K. R; & AMORIM, S. M. C.; Crescimento e Desenvolvimento de *Physalis angulata* Lineu Submetida ao Déficit Hídrico. **Revista acadêmica : ciências agrárias e ambientais**. v. 7, n. 1, p. 65-72, Curitiba, 2009.
- SOUZA, V. C.; ANDRADE, L. A.; BRUNO, R. L. A.; CUNHA, A. O.; SOUZA, A. P.; Produção de mudas de Ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nich.) em diferentes substratos e tamanhos de recipientes. **Agropecuária Técnica**, v. 26, n. 2, p. 98-108, 2005.
- SUBBARAO, G.V. et al. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water stress. **Journal of Plant Physiology**, v.157, n.6, p.651-659, 2000.
- SZEGLETES, Z. et al. Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. **Cereal Research Communications**, v.28, n.4, p.403-410, 2000.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E.; **Fisiologia Vegetal**.3 ed. Porto Alegre:Artmed.719p. 2004.
- TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 419–432, 1998.
- THOMSON, C.J. & GREENWAY, H.; Metabolic evidence for stelar anoxia in maize roots exposed to low O₂ concentrations. **Plant Physiol.** 96:1294-1301. 1991.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Anal Biochemical.**, V. 22: 280-283. 1968.
- VAN RENSBURG, L.; KRÜGER, G. H. J.; KRÜGER, H. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: Its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 141, p. 188-194, 1993.

- VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptation to anaerobic stress. *Annals of Botany*, London, v.79, p.3-20, 1997.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, 2008.
- VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523-539, 2006.
- WARREN, C. R.; LIVINGSTON, N. J.; TURPIN, D. H. Water stress decreases the transfer conductance of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. **Tree Physiology**, v. 24, p. 971–979, 2004.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol hipochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**. V. 39: 971-974. 1967.
- XIONG, L.; SCUMAKER K. S.; ZHU J-K. Cell signaling during cold, drought and stress. **The Plant Cell**, 14: 165-183. 2002.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 2007.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 88–94, 2005.
- YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, p. 1214-1222, 1982.
- YOUNIS, M.E., O.A. EL-SHAHABY, S.A. ABO-HAMED and A.H. IBRAHIM, Effects of water stress on growth, pigments and ¹⁴CO₂ assimilation in three sorghum cultivars. **J. Agron. Crop Sci.**, 185 (2): 73-82. 2000.
- ZHANG, J.; NGUYEN, H. T.; BLUM, A. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. **Journal of Experimental Botany**, n. 50, p. 291–302, 1999.