FÁBIO REIS DALLE MOLLE

Alterações do metabolismo do xiloglucano de reserva em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. submetidas ao défice hídrico

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2011

FÁBIO REIS DALLE MOLLE

Alterações do metabolismo do xiloglucano de reserva em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. submetidas ao défice hídrico

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. MARCO AURÉLIO SILVA TINÉ

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Molle, Fábio Reis Dalle
M726a Alterações no metabolismo de xiloglucano de reserva em plântulas de *Hymanaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang. submetidas ao défice hídrico / Fábio Reis Dalle Molle-- São Paulo, 2011.
53 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Leguminosae. 2.Enzimas. 3. Polissacarídeo. I. Título

CDU: 582.736

Agradecimentos

À Cristina e ao Bruno, meus amores.

Aos meus amados pais, Romualdo e Walkíria, pela minha vida e pelo suporte por todos esses anos.

Aos meus irmãos, Gustavo e Diogo, pela convivência, amizade e apoio.

Ao meu orientador Dr. Marco Aurélio Silva Tiné, pela amizade, paciência e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge, do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol pelo apoio, incentivo e ensinamentos.

A Profa. Dra. Sônia M. C. Dietrich, pelo apoio, simpatia e energia.

À chefe do Núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Dra. Marília Gaspar Mais, pela oportunidade de desenvolver os experimentos.

Às pesquisadoras, Dra. Márcia Regina Braga, Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho, Dra. Lílian Penteado Zaidan, Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo Ribeiro e Dra. Solange Viveiros pela atenção e amizade.

Aos pesquisadores Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar e Dr. Emerson Alves da Silva pela convivência e ajudas.

Ao corpo docente do curso de pós-graduação do Instituto de Botânica, pela construção de conhecimento e oportunidade.

Aos amigos Danilo Centeno, Fernanda Kretschmar, Juliana Iura, Juliana Zerlin, Kelly Simões, Ludmila Raggi, Marina Martins, Marina Veronesi, Rodrigo Cabral, Vanessa Costa, Vanessa Fuentes, Vanessa Oliveira.

Às Dras. Aline Andréia Cavalari Corete e Patrícia Pinho Tonini pela amizade e preciosos ensinamentos.

À Mary Monteiro, técnica do laboratório, pelos auxílios e amizade.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

Índice

1. Introdução.....1
1.1 Reservas.....1
1.2 *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang.....2
1.3. Xiloglucano de reserva.....6
1.4. Défice hídrico.....11
1.5. Respostas moleculares ao défice hídrico.....13
2. Objetivo.....15
3. Material e métodos.....16
4. Resultados.....22
4.1 Experimento de longa duração (parâmetros fisiológicos e bioquímicos).....22
4.2 Experimento de curta duração (atividades enzimáticas).....33
5 Discussão.....39
5.1 Experimento de longa duração (parâmetros fisiológicos e bioquímicos).....39
5.2 Experimento de curta duração (atividades enzimáticas).....43
6. Conclusões.....46
7. Referências bibliográficas.....47

Resumo

Sementes de *Hymenaea courbaril* L. possuem um polissacarídeo de parede celular depositado nas células do parênquima cotiledonar. Este polissacarídeo, denominado xiloglucano, possui uma cadeia principal de glucose, com ramificações de xilose e galactose. O xiloglucano é depositado nas paredes celulares durante a maturação da semente e é desmontado após a germinação, o que o caracteriza como um polissacarídeo de reserva. Seu desmonte é feito pela ação de pelo menos quatro enzimas: xiloglucano endo-trans-glicosilase, β-galactosidase, β-glucosidase e α-xilosidase. A presença deste polissacarídeo de reserva é importante na estratégia de estabelecimento da plântula, pois a remoção dos cotilédones causa um grande efeito no desenvolvimento desta, com uma grande redução da área foliar. Este momento de mobilização acontece quando as primeiras folhas da plântula já estão fotossinteticamente ativas. Nesta etapa do seu desenvolvimento, portanto, a plântula possui duas fontes de carbono independentes: a mobilização do xiloglucano de reserva nos cotilédones e a fotossíntese nas folhas já expandidas. Uma questão essencial para o sucesso do estabelecimento da plântula é: como a plântula coordena o uso de carbono entre essas duas fontes e mantém o suprimento de carbono para as partes em desenvolvimento da plântula (drenos)? A fotossíntese é, tipicamente, um processo cíclico, devido à disponibilidade da luz, sendo possível apenas durante o dia. Sabe-se que as enzimas de desmonte do xiloglucano também apresentam variação ao longo do dia, sendo a atividade das enzimas maior à noite, período de maior mobilização do xiloglucano de reserva. As duas fontes de carbono da plântula, portanto, parecem ocorrer de forma alternada ao longo do dia: a fotossíntese forneceria carbono durante o dia e o xiloglucano de reserva dos cotilédones supriria a demanda noturna do eixo embrionário em desenvolvimento até que o indivíduo se torne completamente autotrófico. Fatores que afetem a fotossíntese, portanto, teriam potencial para alterar tal balanço, uma vez que o eixo teria que sustentar seu crescimento apenas a partir de uma das reservas. A condição de estresse hídrico, por exemplo, é uma condição limitante da fotossíntese. Uma das primeiras respostas ao déficit hídrico é o fechamento estomático, que impede a realização de trocas gasosas e, conseqüentemente, a fotossíntese. A resposta da planta ao estresse hídrico, portanto, tem um grande potencial de alterar o uso das reservas da planta, uma vez que nessa circunstância, a reserva deve suprir toda a demanda energética da plântula. Nosso objetivo foi estudar as respostas fisiológicas das plântulas de *Hymenaea courbaril* L. ao déficit hídrico e o efeito desse déficit sobre a mobilização das reservas. Para isso, as sementes foram embebidas e após a germinação, transferidas para vasos e mantidas

em casa de vegetação por 32 dias até os eófilos começarem a se expandir, quando, então foram iniciados os regimes de rega (diária, a cada 7 e a cada 14 dias). Foram feitas quatro coletas: 32, 39, 46 e 53 dias após o início da embebição. Foram determinados os pesos fresco e seco nos diferentes órgãos (raiz, hipocótilo, epicótilo, cotilédones e folhas), além dos teores de xiloglucano, de carboidratos solúveis e de prolina nos cotilédones. Foram medidos o potencial hídrico no epicótilo, o conteúdo de água, o teor relativo de água e a fluorescência máxima dos eófilos. Para acompanhar as alterações no padrão de mobilização do xiloglucano de reserva, foram determinadas as atividades de β-galactosidase e β-glucosidase dos cotilédones coletados de 8 em 8 horas durante 2 dias no auge da mobilização do xiloglucano de reserva, além do estudo das alterações nos níveis de sacarose nas mesmas amostras. O crescimento das plântulas foi menor naquelas submetidas ao déficit hídrico, o que gerou menores taxas de mobilização do xiloglucano. Estas plantas apresentaram potencial hídrico, conteúdo de água, conteúdo relativo de água e fluorescência mais baixa que as plantas controle. Aos 46 dias, houve um aumento da massa seca nas plantas não estressadas, mas este aumento não ocorreu nas plantas regadas a cada 14 dias. Na última coleta, o rendimento de xiloglucano de reserva foi menor nos tratamentos sob estresse, mostrando a completa exaustão da reserva quando o xiloglucano é a única fonte de carbono. Quanto à atividade enzimática, a atividade foi reduzida nas plantas sob déficit no período que seria a maior mobilização das reservas, corroborando a observação de que as reservas estariam sendo mobilizadas mais lentamente. Não foi detectado um pico de atividade das enzimas à noite, sugerindo que, na ausência da fotossíntese, a atividade das enzimas de mobilização de carbono é mantida com menor variação ao longo do dia, suprindo as necessidades do eixo embrionário durante o dia inteiro. Apesar das atividades enzimáticas mais baixas, no horário em que a sacarose atinge a máxima concentração (10 horas), os cotilédones das plantas submetidas ao estresse apresentaram concentração de sacarose 3 vezes maior que as plantas controle, retornando a valores semelhantes 8 horas depois, o que demonstra a maciça exportação de sacarose durante esse período nas plantas estressadas. Em uma condição de campo, pode-se supor o modelo onde o déficit hídrico reduziria as taxas de crescimento das plântulas, fazendo com que as reservas durassem mais, sustentando a plântula viva sem fotossíntese por mais tempo, até que a condição de estresse não mais fosse imposta à planta. O controle das fontes de carbono, portanto, é um importante elemento na resposta da planta ao estresse ambiental.

Abstract

Seeds of *Hymenaea courbaril* L. have a cell wall polysaccharide accumulated in the parenchymatous cells of the cotyledons. This polymer, called xyloglucan, has a main chain of glucose, with xylose and galactose branches. Xyloglucan is deposited in the cell walls during seed maturation and is disassembled after germination, characterizing it as a reserve polysaccharide. Its disassembling is done by the action of at least four enzymes: xyloglucan endo-trans-glycosylase, α-xylosidase, β-galactosidase and β-glucosidase. The presence of this reserve polysaccharide is important in the strategy of seedling establishment, because the removal of the cotyledons has a huge effect on its development, with a large reduction in leaf area. This moment of mobilization comes when the first leaves of plantlets are already photosynthetically active. At this stage of its development, therefore, the plantlet has two independent sources of carbon: the mobilization of storage xyloglucan in cotyledons and photosynthesis in already expanded leaves. A key issue for successful seedling establishment is: how the seedling coordinates the sink of carbon between these two sources and maintains the supply of carbon to developing parts (sinks)? Photosynthesis is typically a cyclical process, due to the light availability, being possible only during the day. It is known that xyloglucan disassemble enzymes also vary throughout the day, but the enzyme activity is higher at night, when xyloglucan mobilization is greater. The two sources of carbon from the plantlet, therefore, seem to occur on an alternating basis along the day: photosynthesis would provide carbon during the day and storage xyloglucan from cotyledons would supply at night the developing embryonic axis demand until the individual becomes completely autotrophic. Factors affecting photosynthesis therefore have potential to alter this balance, since the axis would have to sustain its growth from just one of the reserves. The condition of water stress, for example, is a limiting condition of photosynthesis. One of the earliest responses to drought is stomatal closure, which prevents gas exchange and therefore photosynthesis. The plant response to water stress, therefore, has great potential to change the use of the plant reserves, since in this circumstance, the storage must supply all the energy of the seedling. Our objective was to study the physiological responses of seedlings of *Hymenaea courbari*l L. to drought and the effect of this deficit on storage mobilization. For this, the seeds were imbibed and after germination, placed in pots and kept in a glasshouse for 32 days until eophylls begin to expand, when then started irrigation schedules (daily, to each 7 and to each 14 days). Four harvests were done: 32, 39, 46 and 53 days after the start of imbibition. The fresh and dry weights in different organs (root, hypocotill, epycotill, cotyledons and leaves) were

determined, besides the levels of xyloglucan, soluble carbohydrates and proline in cotyledons. The water potential in the epycotill, the water content, the relative water content and the fluorescence maximum in the eophylls were measured. To track changes in the pattern of storage xyloglucan mobilization enzymes, the activities of β-galactosidase and β-glucosidase from cotyledons collected from 8 of 8 hours during two days at the peak of mobilization were determined, in addition to the study of changes in sucrose levels in the same samples. The seedling growth was lower in those submitted to drought, which led to lower rates of xyloglucan mobilization. These plants showed water potential, water content, relative water content and fluorescence lower than control plants. At 46 days there was an increase of dry matter in plantlets not stressed, but this increase did not occur in plants watered every 14 days. At the last harvest, the yield of storage xyloglucan was reduced in treatments under stress, showing the complete exhaustion of the reserve when the xyloglucan is the only carbon source. As for the enzymatic activity, it was reduced in plants under deficit in the period that would be the largest mobilization of reserves, supporting the observation that the reserves were being deployed more slowly. A peak of enzyme activity was not detected at night, suggesting that in the absence of photosynthesis, the activity of enzymes of carbon mobilization is maintained with little variation throughout the day, supplying the needs of the embryonic axis during the whole day. Despite lower enzyme activities, the time that achieves the highest sucrose concentration (10 hours), the cotyledons of plants subjected to stress showed sucrose concentration three times higher than control plants, returning to levels similar eight hours later, demonstrating the massive export of sucrose during this period in the stressed plants. In a field condition, it can be assumed the model where the drought would reduce growth rates of seedlings, causing stocks to last more, holding the seedling live without photosynthesis for longer, until the stress condition no longer was imposed on the plant. The control of carbon sources is therefore an important element in plant response to environmental stress.

1. Introdução

1.1. Reservas

O estabelecimento das plântulas durante o crescimento heterotrófico envolve o uso metabolicamente controlado das reservas (mobilização e partição dos produtos) até que estas plantas sejam capazes de extrair do ambiente os recursos necessários ao seu crescimento. Esta transição heterotrofia-autotrofia é considerada uma etapa crítica no ciclo de vida das plantas por ser a etapa de maior mortalidade. A compreensão do controle do metabolismo das reservas, portanto, é essencial para entender a estratégia de uso dos recursos disponíveis para as plântulas.

Tais reservas são geralmente acumuladas em órgãos específicos como o endosperma ou os cotilédones, enquanto a região de maior crescimento geralmente é um meristema situado em outra parte do eixo embrionário. Nas plantas, portanto, existem órgãos que atuam como fontes de carboidratos e outros que atuam como drenos (Taiz & Zeiger, 2009). Tais relações fonte-dreno são dinâmicas e variam não apenas ao longo do desenvolvimento da planta como também ao longo de um dia. Órgãos de reserva, por exemplo, atuam como potentes drenos durante o acúmulo das reservas e passam a atuar como fontes quando da mobilização destas reservas.

Uma das principais formas de armazenamento de carboidratos é através dos polissacarídeos de reserva de parede celular de sementes, como o galactomanano, o galactano e o xiloglucano, que são reservas para a plântula em desenvolvimento, sendo degradados após a germinação (Buckeridge & Reid, 1996).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular são relativamente inertes no que concerne à sua reatividade química e apresentam diferentes graus de solubilidade em água. Essas características conferem vantagens que são similares às do amido (alta compactação e baixa reatividade) e tornam possível a existência de um "compartimento celular" (a parede celular) que permite o fluxo de água com um grau de liberdade considerável. Por outro lado, o custo para produzir tais polímeros é alto, pois tais compostos necessitam de um complexo sistema de biossíntese (que requer nucleotídeos açúcares como doadores de monossacarídeos), secreção e montagem no meio extracelular (Buckeridge *et al.*, 2000).

Outra vantagem potencial destes polímeros é que eles requerem um arsenal específico de enzimas para sua degradação, o que limita o número de predadores capazes de se alimentar das sementes. Portanto, os polissacarídeos de reserva de parede celular têm função principal

como reserva (fonte de carbono) para utilização durante o desenvolvimento da plântula e possuem funções secundárias como controle de embebição e propriedades mecânicas dos cotilédones. São classificados em 3 grupos distintos: os mananos, os (arabino)galactanos e os xiloglucanos. Esta classificação é baseada essencialmente na estrutura química desses polímeros (Buckeridge *et al.*, 2000).

1.2. *Hymenaea courbaril* L. (Hayne) Lee & Lang.

O jatobá (*Hymenaea courbaril*) (figura 1) é uma espécie arbórea, pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Caesalpinoideae e gênero *Hymenaea.* Este gênero surgiu na África a cerca de 65 milhões de anos, espalhou-se e adaptou-se muito bem nas regiões neotropicais gerando muitas espécies.

Ocorre em Floresta Estacional Semi Decidual e Floresta Ombrófila Densa até zonas subtropicais secas e úmidas, tolerando precipitação entre 600 e 4200 mm, temperatura média anual entre 22 e 28 ^{o}C e solos com pH entre 4 e 7,5. É típica de floresta madura e primária, sendo considerada espécie secundária tardia (ou clímax) na sucessão florestal (Lee & Langenheim, 1975).

Hymenaea courbaril ocorre ao longo dos rios em florestas relativamente secas do estado de São Paulo e de partes adjacentes do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Floresce de janeiro a novembro e os frutos estão geralmente maduros em setembro (Lee & Langenheim, 1975). Sua altura pode chegar a 30 m, com tronco de até 200 cm de diâmetro.

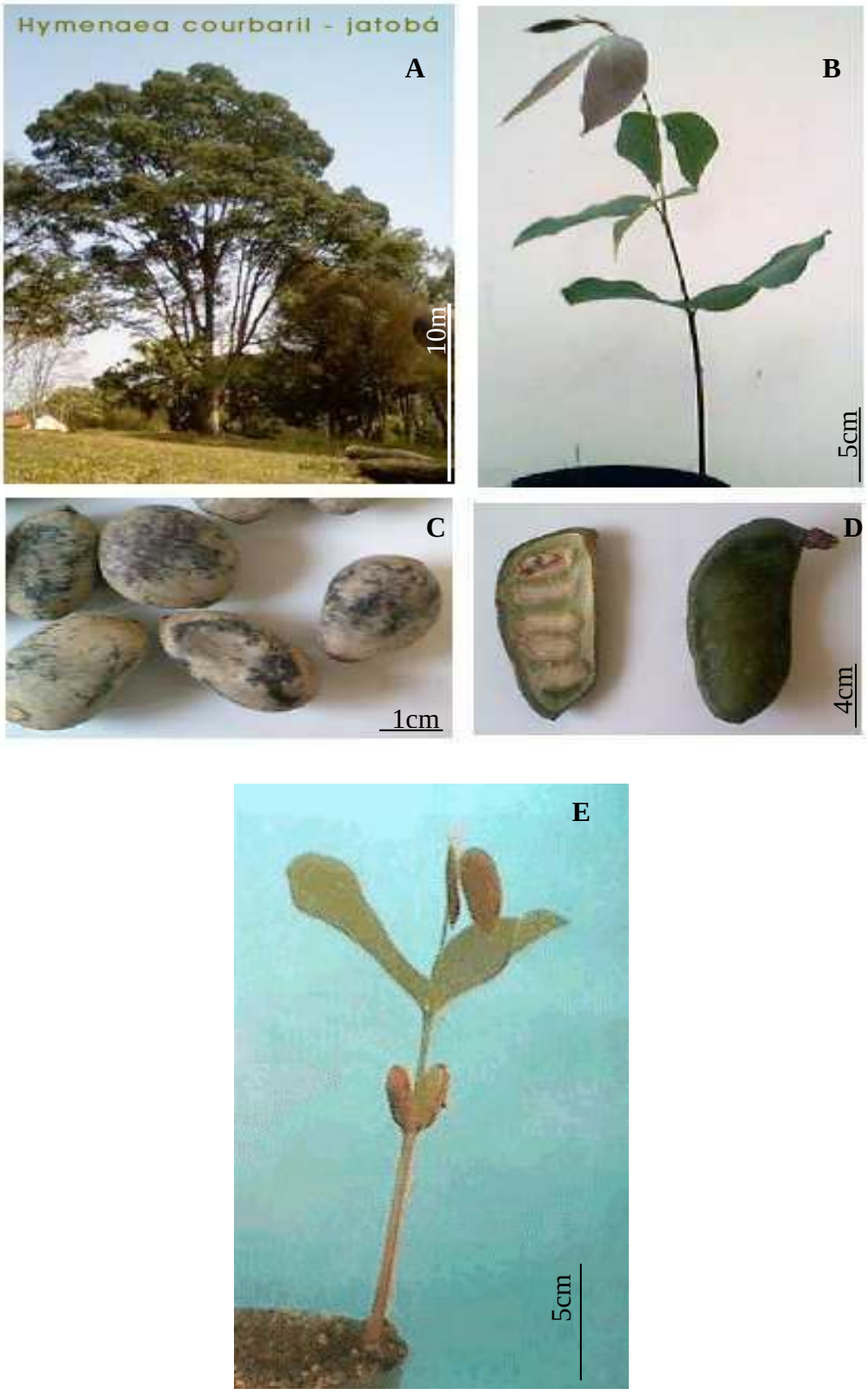

Figura 1. A espécie *Hymenaea courbaril* L. em diferentes fases de seu ciclo de vida. **A**- planta adulta, **B**- plântula, **C**- sementes, **D**- frutos, **E**- plântula com os cotilédones.

H. courbaril possui grande plasticidade fenotípica, característica que proporciona grande capacidade de distribuição dos organismos de uma espécie (Sultan, 2003). Plasticidade fenotípica denota a capacidade de um genótipo apresentar variações nos fenótipos morfológicos e fisiológicos em resposta a diferentes condições ambientais (West-Eberhard, 1989; Garland & Kelly, 2006), devido à necessidade de desenvolvimento de mecanismos fisiológicos e arranjo reprodutivo altamente específico para uma espécie tornar-se capaz de colonizar diferentes ambientes (Sultan, 2000).

Devido à plasticidade, *H. courbaril* é considerada uma das mais bem-sucedidas espécies do gênero *Hymenaea*, com 17 variedades diferentes em florestas tropicais do México até os países tropicais da América do Sul. No Brasil coloniza biomas de condições ambientais muito distintas, como as que ocorrem na Caatinga e na Mata Atlântica (figura 2).

Além da importância ecológica, *H. courbaril* apresenta potencial agronômico para utilização do caule e dos frutos. Porém esta espécie está ameaçada de extinção devido à exploração da sua madeira e a destruição de seu habitat.

Esta espécie possui sementes grandes com cotilédones globóides não-fotossintetizantes (Santos & Buckeridge, 2004). Os cotilédones são órgãos da plântula ricos em reservas, importantes na estratégia da espécie para o estabelecimento das plântulas. São compostos por 46% de carbono, 9% de proteína e 3,5% de lipídeos. As sementes germinam em sub-bosque da floresta madura, sendo as plântulas tolerantes a sombra (Tiné, 1997).

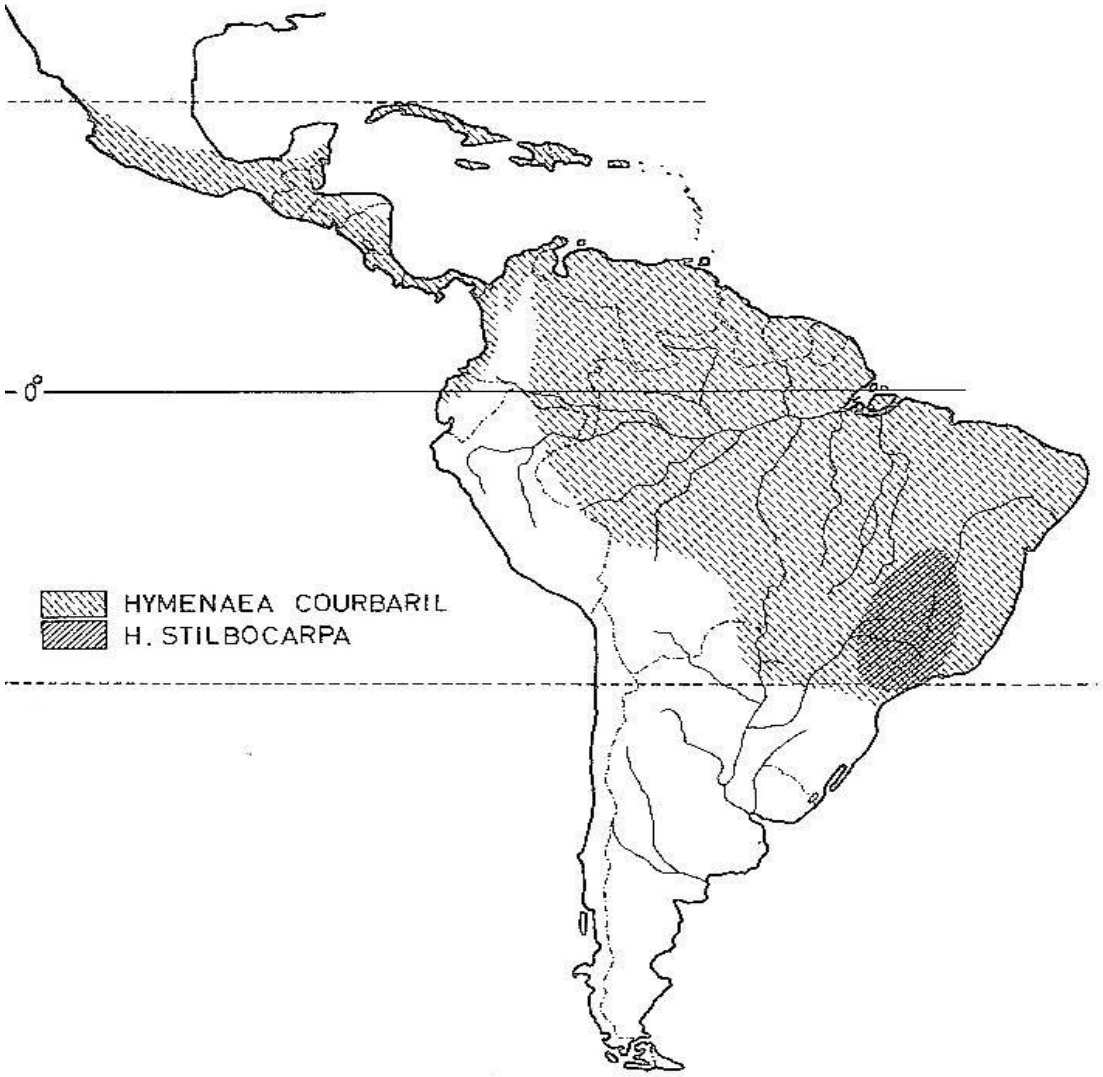

Figura 2. Distribuição geográfica do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). Retirado de Langenheim, 1973.

1.3. Xiloglucano de reserva

Xiloglucanos são polissacarídeos de parede celular formados por uma cadeia principal de β-D-(1→4)-glucano ramificada com ligações α-(1→6) por unidades de D-xilopiranosídeos ou β-D-galactopiranosídeo-(1→2)-D-xilopiranosídeos. Exceto pela ausência de terminais fucosil ligados [α-L-(1→2)] aos grupos β-D-galactosídeos, existe uma grande semelhança entre xiloglucanos de reservas de sementes e xiloglucanos de paredes primárias, em tecidos vegetativos de dicotiledôneas (Hayashi, 1989).

Desde o fim do século 19, já se sabia que a reserva de algumas sementes consistia em um polissacarídeo de parede celular (Heinricher, 1888; Reiss, 1889). Como essa substância impregnava com solução de iodo/iodeto de potássio de forma semelhante ao amido, ela foi chamada de amilóide. Os estudos sobre o xiloglucano de reserva intensificaram-se no século 20, a partir da descoberta de que o amilóide presente na parede de células cotiledonares de *Tamarindus indica* L. era formada por glucose, xilose e galactose, nas proporções 3:2:1 (Krishna & Goose, 1942, 1943). Kooiman (1960) detectou a presença deste polissacarídeo em diversas sementes, mas apenas em algumas espécies a mobilização do xiloglucano foi estudada em detalhes, como *Tropaeolum majus* (Edwards *et al*., 1985), *Tamarindus indica* (Reis *et al*., 1987), *Copaifera langsdorffii* (Buckeridge *et al*., 1992) e *Hymenaea courbaril* (Tiné *et al*., 2000, Santos & Buckeridge, 2004).

Dentre as espécies acima citadas, *Tropaeolum majus* é o sistema que contem xiloglucano melhor estudado até o momento. O grupo do professor Grant Reid da Universidade de Stirling, Escócia, mostrou que a taxa de mobilização de xiloglucano nesta espécie coincidiu com o aumento e posterior decréscimo nos níveis de quatro enzimas hidrolíticas: endo-β-glucanase, β-galactosidase (β-gal), α-xilosidade (α-xil) e β-glucosidase (β-glu) (Edwards *et al*., 1985). A enzima endo-β-glucanase foi purificada por Edwards *et al*. (1986) e estudos adicionais no seu modo de ação sobre o xiloglucano foram feitos por Fanutti *et al*. (1993), demonstrando que esta enzima é uma xiloglucano-endo-transglicosilase.

Uma das formas mais usuais de estudo do xiloglucano é a hidrólise do polímero com uma endo-β-glucanase e análise dos oligossacarídeos resultantes. O padrão de oligossacarídeos gerados por digestão com celulase varia de acordo com a espécie de onde o xiloglucano foi extraído mas, em geral, os oligossacarídeos resultantes possuem 4 glucoses na cadeia principal, três delas com ramificação de xilose, diferindo entre si pelo número e posição das ramificações de galactose. Além destes oligossacarídeos gerados, Buckeridge *et*

al. (1997) revelaram a existência de uma nova classe de oligossacarídeos em *H. courbaril*, que contem 5 glucoses na cadeia principal (figura 3).

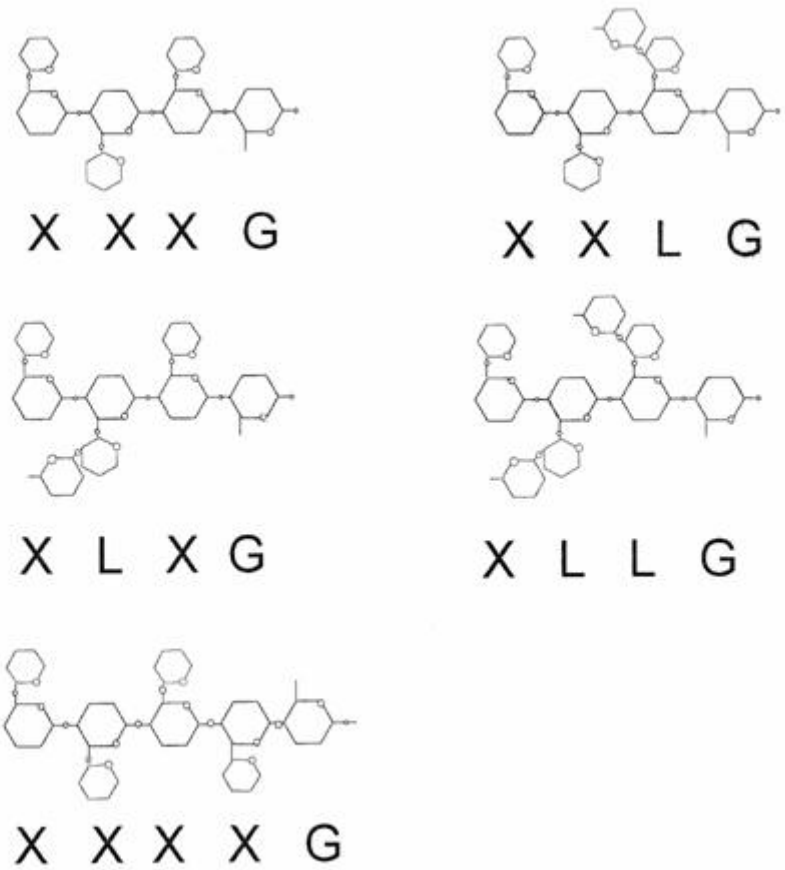

Figura 3. Oligossacarídeos obtidos pela digestão de xiloglucano de reserva com celulase de *Trichoderma reseii*. Os oligossacarídeos com 4 glucoses na cadeia principal são amplamente distribuídos nas plantas, mas o XXXXG só foi descrito até hoje em *Hymenaea courbaril* L. Retirado de Tiné (2002).

Tiné *et al*. (2000) propuseram um modelo de degradação do xiloglucano de reserva em *Hymenaea courbaril* (figura 4). O polissacarídeo é primeiro hidrolizado pela xiloglucano-endo-β-(1→4)-glucanase (XET) gerando oligossacarídeos. Em seguida inicia-se o período de degalactosilação dos oligossacarídeos através do incremento da atividade da β-galactosidase (β-gal). Os fragmentos degalactosilados sofrem então o segundo ciclo de degradação liberando monossacarídeos livres, através do aumento de atividade das enzimas α-xilosidade (α-xil) e β-glucosidase (β-glc).

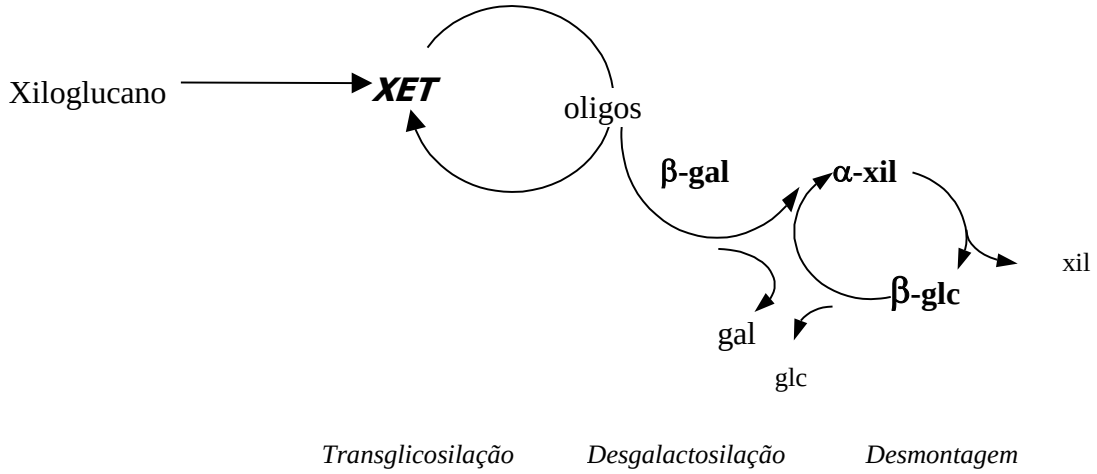

Figura 4. Modelo proposto por Tiné *et al*. (2000) para a degradação do xiloglucano de reserva em *Hymenaea courbaril* L.

A ausência de outros oligossacarídeos, além da sacarose, nos cotilédones de *H. courbaril*, sugere que este dissacarídeo seja a forma de transporte de carbono predominante entre os órgãos fonte (cotilédones e eófilos) e os drenos (plântula em desenvolvimento) (Molle *et al.*, 2009).

Santos & Buckeridge (2004) injetaram sacarose marcada radioativamente (^{14}C-sacarose) em um dos cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* e acompanharam a distribuição da marcação radioativa após 72 horas. O eófilo neste ponto do desenvolvimento já se encontra fotossinteticamente ativo e já não representa um dreno importante. Embora no cotilédone onde a radioatividade foi injetada (tratado) a contagem tenha sido alta, a contagem no cotilédone não tratado foi zero, o que mostrou que não houve importação nenhuma de sacarose para aquele órgão. Os órgãos que apresentaram as maiores contagens por tecido foram metáfilo e epicótilo. A maior parte do carbono exportado do cotilédone teve como destino a parte aérea em expansão.

A mobilização do xiloglucano de reserva em *H. courbaril* é controlada pelo ácido indol-acético produzido pela parte aérea em crescimento. Este hormônio age na modulação da expressão de genes que codificam as hidrolases de parede celular, na atividade da bomba de prótons que reduz o pH apoplástico e no estabelecimento do sistema vascular cotiledonar. Com o aumento da degradação do xiloglucano, os monossacarídeos são transportados para o citoplasma, onde são metabolizados em sacarose e amido. A sacarose produzida é dirigida principalmente para a parte aérea em expansão. A luz promove o desenvolvimento dos órgãos aéreos, utilizando o carbono da sacarose proveniente da mobilização das reservas

cotiledonares como esqueleto. Consequentemente, a disponibilidade do ácido indol-acético para os cotilédones cresce, estimulando a mobilização do xiloglucano de reserva (Santos *et al.* 2004).

Em *H. courbaril*, a degradação do xiloglucano de reserva ocorre ao mesmo tempo em que a fotossíntese é iniciada nos eófilos. Neste caso, a plântula em desenvolvimento possui duas possíveis fontes de carbono simultaneamente: a reserva dos cotilédones e a fotossíntese. No caso da fotossíntese, existe um ritmo circadiano associado à disponibilidade de luz, que está baseado num oscilador endógeno que mantem o ritmo dos processos aos quais está acoplado, que permite às plantas anteciparem mudanças diárias.

Embora o processo fotossintético inicie-se logo aos primeiros raios de Sol (6 horas) e cesse às 18 horas, a assimilação de carbono pela fotossíntese em *H. courbaril* inicia-se por volta das 8 horas, atinge o máximo às 11 horas e no meio da tarde (15 horas), ela já não acontece (Barriga, 2003) (figura 5). Portanto as plântulas possuem pouco mais de seis horas durante o dia para assimilar o carbono proveniente da fotossíntese dos eófilos.

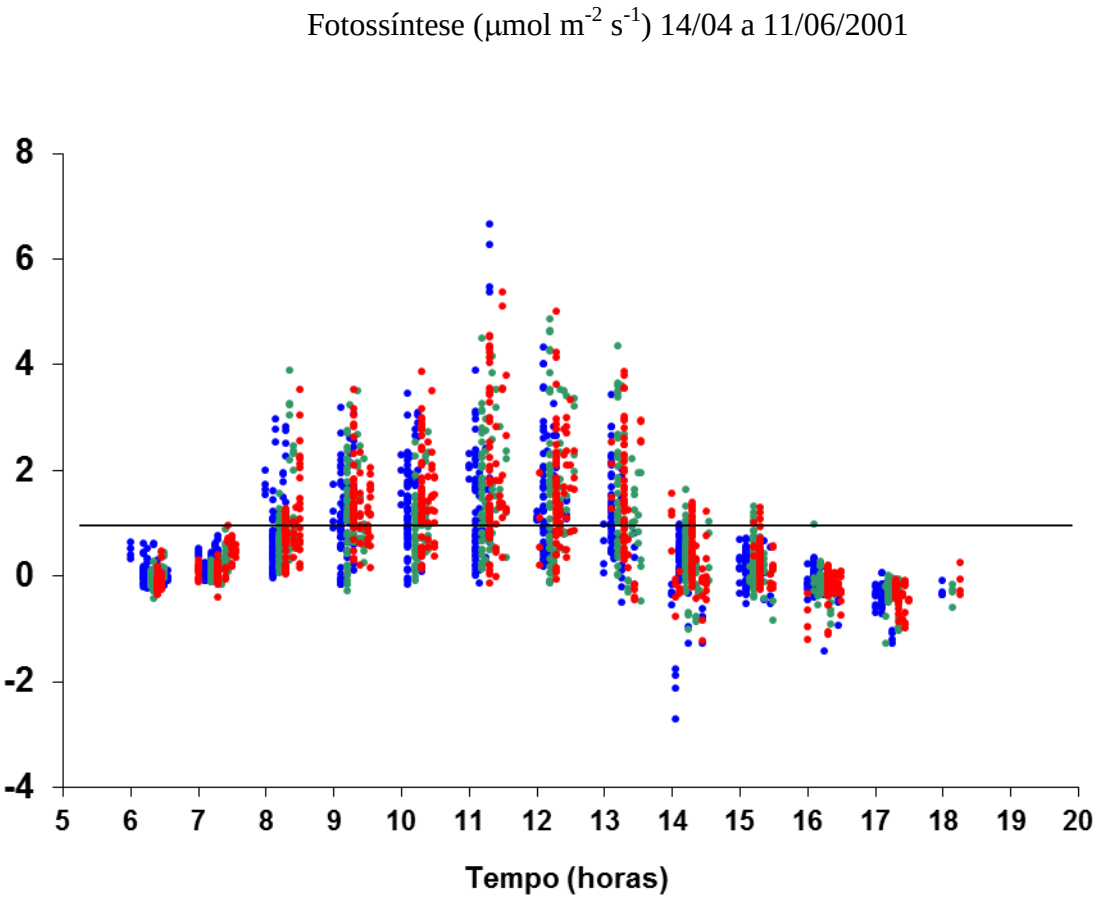

Figura 5. Assimilação de carbono pela fotossíntese em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. Dados gentilmente cedidos por Madeleine Barriga.

Por outro lado, foi verificado que a degradação do xiloglucano de reserva ocorre durante a noite (Amaral, 2005) (figura 6). A sacarose parece ser a forma de transporte ao longo da planta, do carbono proveniente da fotossíntese e da mobilização das reservas cotiledonares.

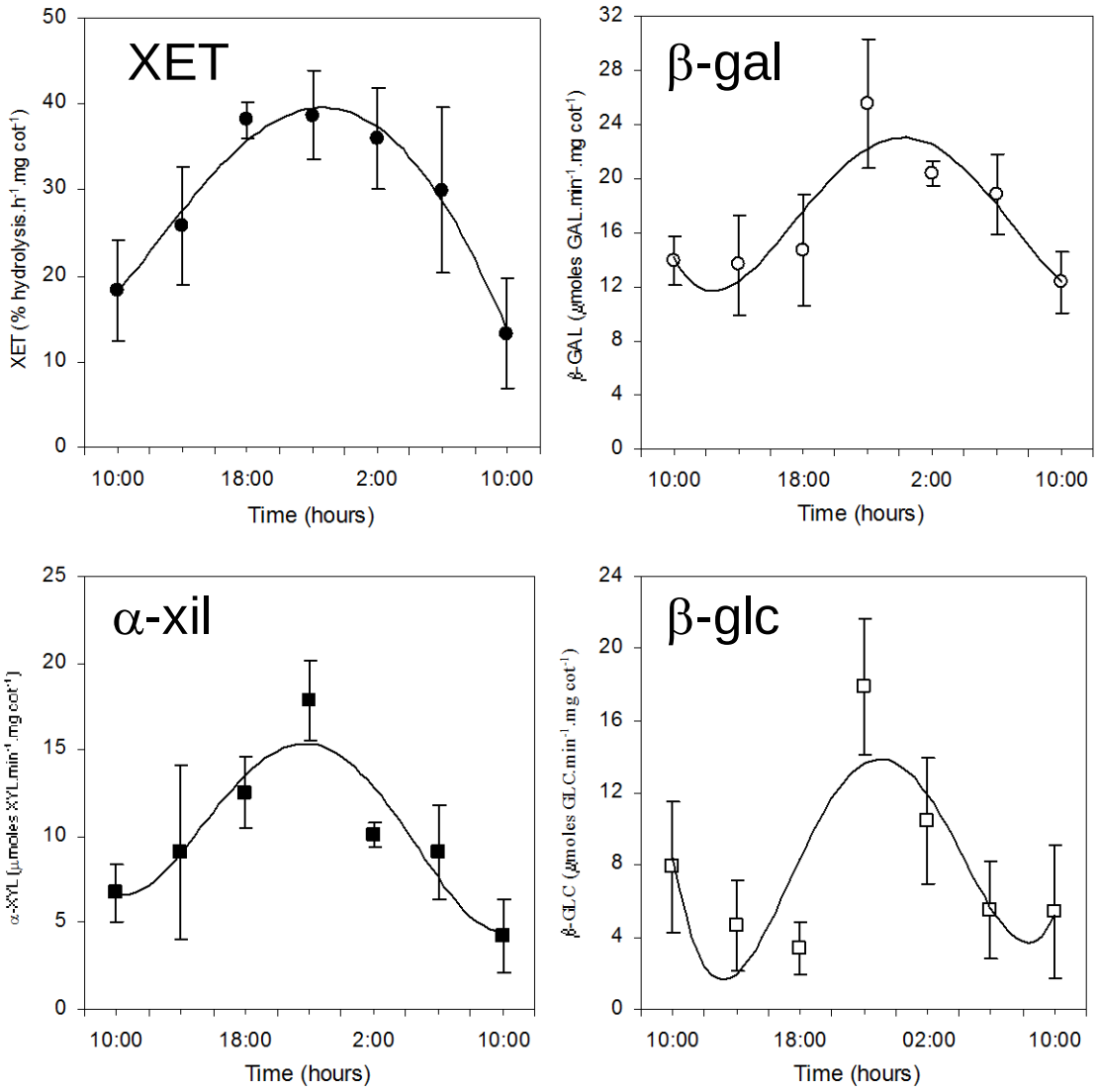

Figura 6. Mudanças diárias nas atividades específicas das hidrolases de xiloglucano em cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. As barras representam o desvio padrão (n=3). Dados gentilmente cedidos por Lourdes V. Amaral.

As duas fontes de carbono, portanto, parecem estar finamente sincronizadas de modo que durante o período diurno, a fotossíntese nas folhas maduras produz a sacarose exportada para o resto da planta. Durante a noite, as reservas de xiloglucano são mobilizadas, o que mantém a disponibilidade de carbono para os tecidos em crescimento durante todo o dia. A própria disponibilidade de sacarose nos tecidos poderia funcionar como um sinalizador no processo, uma vez que além de fonte de energia, a própria sacarose pode atuar como um regulador direto ou indireto da expressão gênica (Winter & Huber, 2000). Portanto, existe um balanço na disponibilidade de carboidratos que visa o desenvolvimento da plântula. No caso das plântulas de *H. courbaril*, durante a mobilização do xiloglucano de reserva, o modelo atual propõe que as folhas maduras atuariam como fonte durante o período luminoso do dia e à noite, com a redução da capacidade de exportação das folhas, a mobilização do xiloglucano de reserva seria estimulada, aumentando a capacidade de exportação dos cotilédones.

Para que a fotossíntese aconteça, é necessário que haja trocas gasosas entre o ambiente e as folhas através dos estômatos. Porém, estas microscópicas aberturas que comunicam o ambiente interno foliar com o ambiente externo, principalmente na face abaxial das folhas onde encontram-se abrigadas da luminosidade intensa e das altas temperaturas, são responsáveis pela perda de água através da transpiração. Quando as plantas são submetidas à restrição hídrica, as células-guarda adjacentes ao orifício estomático perdem turgor, o que ocasiona o fechamento estomático impedindo a perda de água e as trocas gasosas. Conseqüentemente o processo fotossintético não acontece.

Por essa razão, o défice hídrico foi o mecanismo escolhido para que a fotossíntese, uma das fontes de carbono para a plântula em desenvolvimento, fosse inibida. Ainda não se sabe qual(is) mudança(s) ocorreria(m) na mobilização do xiloglucano de reserva, a outra fonte de carbono.

1.4. Défice hídrico

Em algumas regiões do planeta Terra, a falta de água é uma das principais limitações à produtividade, tanto em agrossistemas quanto em ecossistemas naturais.

Na natureza, a intensidade e a distribuição das chuvas definem o regime hídrico, influenciando desde o desenvolvimento e produtividade dos indivíduos até a distribuição das populações e a biodiversidade dos ecossistemas. Em escala global, produtividade primária, distribuição das espécies e diversidade das comunidades vegetais estão relacionadas aos gradientes das chuvas e à disponibilidade hídrica (Engelbrecht & Kursar, 2003).

Adicionalmente, as alterações climáticas previstas para os próximos anos devidas ao aquecimento global tornam críticos os estudos sobre a utilização da água pelas espécies nativas. Estes estudos são de extrema importância não apenas para conservar os biomas, mas também para estabelecer estratégias de recuperação de áreas degradadas.

Para as plântulas, as condições são potencialmente mais críticas, considerando que na superfície do solo é extremamente comum a falta de água, mesmo que haja em quantidade suficiente para indivíduos adultos nas camadas mais profundas do solo. Assim, na maioria dos ecossistemas, raízes superficiais estão frequentemente expostas à restrição hídrica (Espeleta & Eissenstat, 1998; Cavender-Bares & Bazzaz, 2000).

A sobrevivência das plântulas consiste em um dos estágios mais críticos do desenvolvimento das espécies vegetais, sendo frequentemente reduzida pela seca e a dessecação dos solos (Padilla & Pugnaire, 2007). Por esse motivo, a diversidade de espécies pode ser limitada se as plântulas nesses ambientes forem incapazes de lidar com a baixa disponibilidade de água (Schenk & Jackson, 2002).

O estabelecimento do défice hídrico decorrente da seca acontece quando a absorção de água pelo sistema radicular não consegue atender as demandas, inclusive aquelas consideradas essenciais ao crescimento da planta: a fotossíntese e a transpiração da parte aérea (Fan *et al.*, 2006). Antes que o défice hídrico se estabeleça, as raízes têm que "sentir" a seca no solo e comunicar à parte aérea, o que produz uma resposta integrada da planta, tornando possível sua sobrevivência até que a disponibilidade de água aumente. Tal comunicação é feita por vários meios além da redução no fluxo ascendente de água (Davies & Zhang, 1991). As respostas ao défice hídrico podem ocorrer tanto em curto prazo, devido à redução da condutância estomática (Fotelli *et al.*, 2000), como em longo prazo, devido às adaptações fisiológicas que permitem que a planta mantenha a sua atividade biológica, seu crescimento e sobreviva em ambientes áridos.

Por exemplo, atribui-se à seca a diminuição drástica do crescimento de raízes (Espeleta & Eissenstat, 1998), ou até a morte de tecidos radiculares em ecossistemas florestais, (Deans 1979) que podem ser resultado de um mecanismo de alocação para aperfeiçoar a utilização do carbono disponível (Espeleta & Eissenstat, 1998). Sob condições que impedem a absorção de água e nutrientes, como em solos que se apresentam secos especialmente nas regiões em contato com as superfícies absorvedoras das raízes, o carbono deve ser utilizado nos mecanismos de manutenção da raiz, sem nenhum benefício imediato para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Fotelli e colaboradores (2000), em um experimento com duas espécies do gênero *Quercus*, relataram aumento na proporção de raízes finas, diminuição da área foliar, redução

do potencial hídrico e da condutância estomática, além de danos irreversíveis no tecido foliar, com consequente abscisão das folhas em resposta ao défice hídrico. Ambas espécies são arbóreas e decíduas. Porém, algumas características de demonstração de tolerância ao défice hídrico apresentadas foram sutilmente diferentes: *Quercus macrolepis* demonstrou condutância estomática relativamente maior e menor potencial hídrico em relação à *Quercus ilex*, que iniciou o fechamento estomático mais cedo para evitar sérias alterações em seu status hídrico.

Desse modo, segundo Davies & Zhang (1991), as adaptações fisiológicas abrangem a ação de genes. Portanto, os avanços nos estudos da biologia molecular de resposta à seca devem estar associados ao conhecimento da bioquímica e fisiologia das plantas sujeitas ao défice hídrico.

1.5. Respostas moleculares ao défice hídrico

A planta submetida à seca apresenta decréscimo do potencial hídrico do tecido vegetal, fechamento estomático, queda da fotossíntese e inibição do desenvolvimento, em resposta a atividades moleculares promovidas durante o défice hídrico. Algumas dessas atividades incluem o acúmulo de compostos osmoticamente ativos, como poliálcoois (Ramanjulu & Bartels, 2002), manitol, sorbitol, (Yordanov *et al.*, 2003) e de solutos orgânicos de pequenas massas moleculares responsáveis pelo ajuste osmótico, como prolina (Nayyar & Walia, 2003; Yordanov *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2005) e glucose, este último devido à alteração do metabolismo de carboidratos como aumento da atividade de invertase e hidrólise de amido (Pelleschi *et al.*, 1997, Chaves *et al.*, 2002); alterações na expressão de aquaporinas (Alexandersson *et al.*, 2005; Luu & Maurel, 2005) e outros genes-alvo, e rigidez da parede celular (Fan & Newmann, 2004); aumento das concentrações de ácido abscísico (ABA) no xilema (Zhang & Davies, 1989; Loewenstein & Pallardy, 1998; Yordanov *et al.*, 2003), e formação de radicais e liberação de componentes anti-oxidantes, como ascorbato, glutationa e α-tocopherol (Yordanov *et al.*, 2003).

O ácido abscísico (ABA) é o hormônio vegetal que controla o início e a manutenção da dormência de sementes e de gemas, além de regular o crescimento e a abertura estomática, em especial quando a planta está sob estresse hídrico (Taiz & Zeiger, 2009). O ABA é encontrado em todas as plantas vasculares e tem sido detectado na maioria dos tecidos vegetais, embora as concentrações de ABA possam variar muito (até 50 vezes sob condições de seca) em tecidos específicos durante o desenvolvimento ou em resposta às mudanças nas condições ambientais.

O ABA e a alcalinização da seiva do xilema são dois sinais químicos que as raízes enviam para o caule, à medida que o solo seca. O aumento do pH da seiva do xilema pode fazer com que mais ABA da folha seja translocado para os estômatos pela corrente de transpiração. Sua sinalização nas células-guarda envolve a ligação da molécula do hormônio com receptores intra e extracelulares, que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio que ativam canais de cálcio da membrana plasmática e do tonoplasto. O aumento da concentração do Ca^{+2} intracelular causa o bloqueio dos canais de K^{+} para o interior da célula e abertura dos canais de Cl^{-} para o exterior celular, causando despolarização da membrana que promove efluxo massivo do K^{+}. O resultado desse fluxo de íons é a diminuição de turgidez na célula-guarda, que tem como conseqüência o fechamento estomático.

A maioria dos trabalhos sobre os efeitos do défice hídrico utiliza como modelo monocotiledôneas de interesse agronômico, como trigo (Asseng *et al.*, 1998; Piro *et al.* 2003; Morillon & Lassalles, 2002), milho (Sharp & LeNoble, 2002; Sharp *et al.*, 2004; Fan & Neumann, 2004), espécies florestais decíduas (Fotelli *et al.*, 2000; Cavender-Bares & Bazzaz, 2000; Thomas & Gausling, 2000), além de lenhosas de interesse agroflorestal como Pinus sp. (Kolb & Robberecht, 1996; Lebourgeois *et al.*, 1998; Sayer & Haywood, 2006). Por outro lado, pesquisas sobre as respostas de espécies nativas tropicais de crescimento lento (perenes) ao défice hídrico ainda são escassas. Os trabalhos existentes com espécies perenes são realizados em plantas cultivadas como o café (Pinheiro *et al.*, 2004) e plantas cítricas (Espeleta & Eissenstat, 1998) e, geralmente, limitam-se a medidas de crescimento como comprimento e massa do sistema radicular. Aqueles que utilizam plântulas como modelos biológicos para tais estudos são ainda mais raros (Engelbrecht & Kursar, 2003). Dessa maneira, esses fatores justificam o estudo dos efeitos do défice hídrico em plântulas de *Hymenaea courbaril* L., uma espécie arbórea, perene e de ciclo de vida longo.

2. Objetivo

Considerando a distribuição geográfica da espécie *Hymenaea courbaril* L, que ocorre em locais com ampla variação de regime hídrico, nosso objetivo é estudar as conseqüências do estresse hídrico sobre a mobilização das reservas nas plântulas desta espécie e, em especial, os efeitos sobre as variações diárias no ritmo de degradação do polissacarídeo de reserva.

3. Material e métodos

As sementes de *Hymenaea courbaril* L. foram obtidas do Instituto Florestal. Foram desinfestadas, escarificadas, embebidas e, após a germinação, transferidas para vasos com quartzo que foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura média de 22,5 ^{o}C por cerca de 15 dias até que os eófilos, par de folhas que emergem da abertura dos cotilédones, começassem a se expandir. Este foi o advento que marcou o início do experimento, porque neste estágio do desenvolvimento das plântulas ocorre o início da mobilização do polissacarídeo de reserva de parede celular (xiloglucano).

O início do experimento consistiu da primeira de 4 coletas destrutivas e da divisão das plântulas restantes em 3 lotes, sendo que cada lote foi submetido a diferentes regimes de regas. Inicialmente, os regimes adotados num primeiro experimento foram: rega diária para um dos lotes, considerado controle; rega a cada 3 dias para outro lote e rega a cada 5 dias para o terceiro grupo. As plântulas foram sempre regadas no final da tarde.

As coletas destrutivas foram feitas antes das 9:00 da manhã: uma, como descrito acima, na implementação do regime de regas, aos 33 dias após o início da embebição (ou 33 DAE). As outras coletas foram efetuadas aos 38 DAE, 43 DAE e 48 DAE (figura 7).

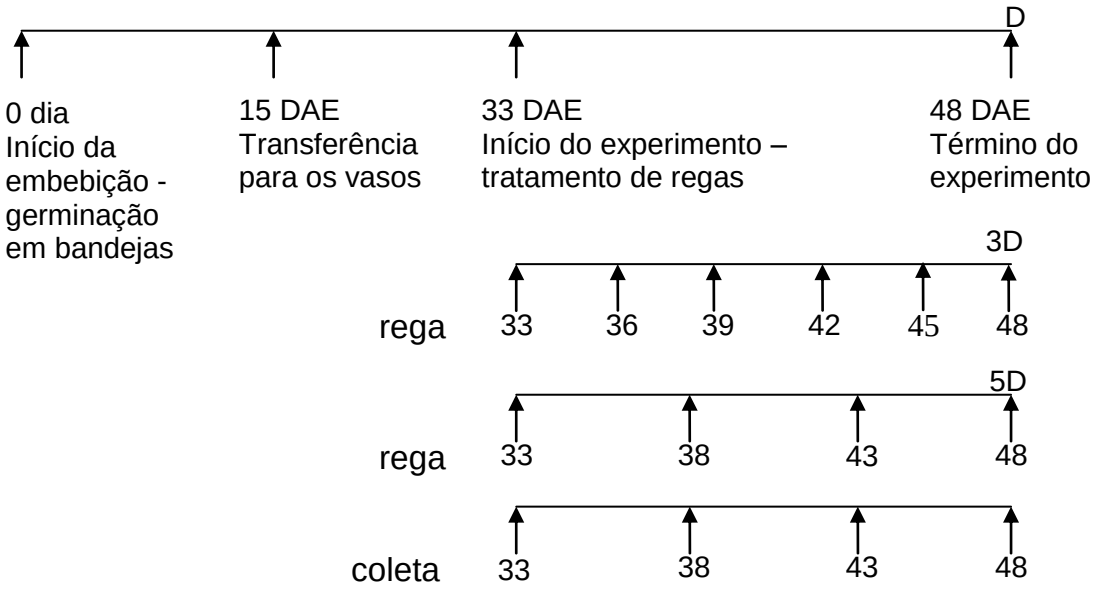

Figura 7. Delineamento do 1º experimento, realizado durante o verão de 2008, de submissão de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. ao estresse hídrico durante a mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (controle), 3D = rega a cada 3 dias, 5D = rega a cada cinco dias. DAE = dias após o início da embebição das sementes.

Em cada coleta, 5 plântulas foram utilizadas para a avaliação prioritária do status hídrico, para a efetiva caracterização do défice hídrico, com a aferição do potencial hídrico do epicótilo (com o auxílio de uma câmara de Scholander) e do teor relativo de água dos eófilos (CRA), que permaneceram imersos em água destilada em placas de Petri durante 24 horas. O CRA foi calculado segundo a expressão:

$$CRA = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100.$$

MF = Massa Fresca, MS = Massa Seca, MT = Massa Túrgida.

Nos cotilédones das plântulas coletadas, o teor de xiloglucano foi medido da seguinte forma: os órgãos congelados foram liofilizados, pulverizados, colocados em microtubos e pesados. 200 mg de amostras foram submetidos à extração etanólica de açúcares, que foi feita com 1000 µL de etanol 70%, em banho a 80^0C por 40 minutos, seguida por centrifugação e retirada do sobrenadante. Este procedimento foi repetido 5 vezes, perfazendo 5,0 mL de sobrenadante submetido a posterior secagem em baixa pressão com centrifugação (Hetovac). Após a secagem do material, o mesmo procedimento foi repetido para a extração aquosa do xiloglucano. O polissacarídeo de reserva extraído no sobrenadante foi liofilizado e pesado.

Os valores de potencial hídrico (figura 8A) apresentaram acréscimo do início ao fim do período experimental em todos os tratamentos. Houve um aumento nos valores do conteúdo relativo de água (figura 8B) entre a 1ª e 2ª coletas, sem diferenças significativas entre os tratamentos no decorrer do experimento. O rendimento do xiloglucano extraído dos cotilédones (figura 8C) também apresentou variações estatisticamente insignificantes entre os três tratamentos de rega no decorrer e ao final do experimento.

Os resultados deste experimento preliminar mostraram que o intervalo entre as regas foi insuficiente para que as plantas apresentassem sinais de estresse hídrico, de forma que foi necessário o desenvolvimento de um novo delineamento experimental. Os lotes, com exceção daquele que receberia rega diária (controle), deveriam ser regados em um intervalo superior a 3 e 5 dias, porém, o tempo de duração do experimento deveria contemplar o prazo de mobilização das reservas cotiledonares.

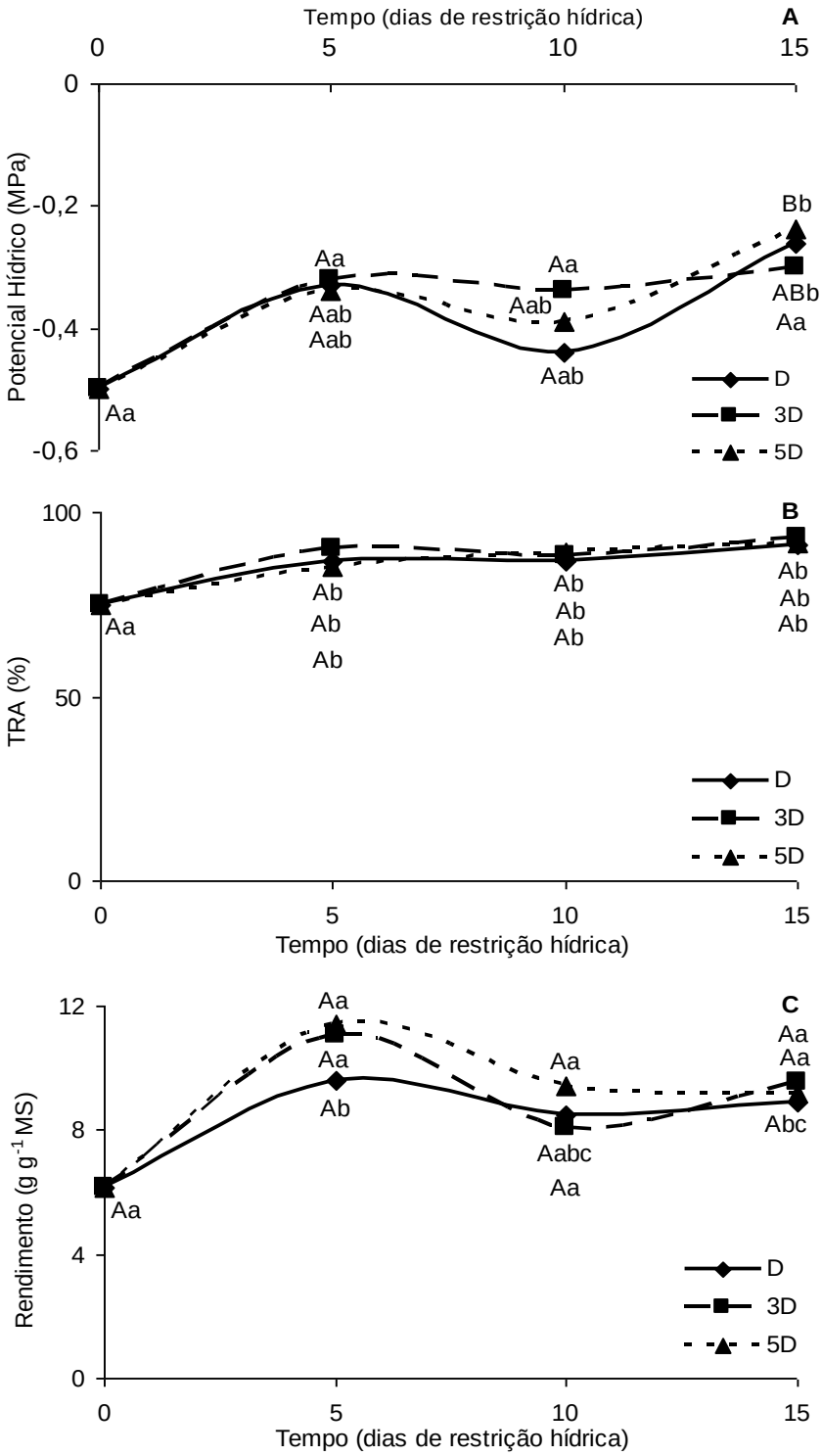

Figura 8. Potencial hídrico (A) de epicótilos, teor relativo de água (B) de eófilos e rendimento do extrato em água (C) de cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (controle), 3D = rega a cada 3 dias, 5D = rega a cada cinco dias. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. (p = 0,05). (n = 5).

Assim, no novo experimento de longa duração, as plântulas foram divididas em 3 grupos, cada um submetido aos seguintes regimes de rega: diária, a cada 7 dias e a cada 14 dias, conforme descrito na figura 9. As regas das plântulas foram feitas no final da tarde. Para obtenção das plântulas para o novo experimento, o procedimento efetuado no experimento anterior foi repetido a temperatura média de 25,2 ^{o}C, até que aos 32 dias após o início da embebição foi feita a primeira das coletas destrutivas antes das 9:00 da manhã. Também foi feita a separação das plântulas nos três lotes, que passaram a receber o tratamento de regas com os novos intervalos. Outras quatro coletas destrutivas foram feitas para a caracterização do estresse hídrico, com a medição do potencial hídrico dos epicótilos e do teor relativo de água dos eófilos aos 39, 46, 53 e 60 DAE (figura 9).

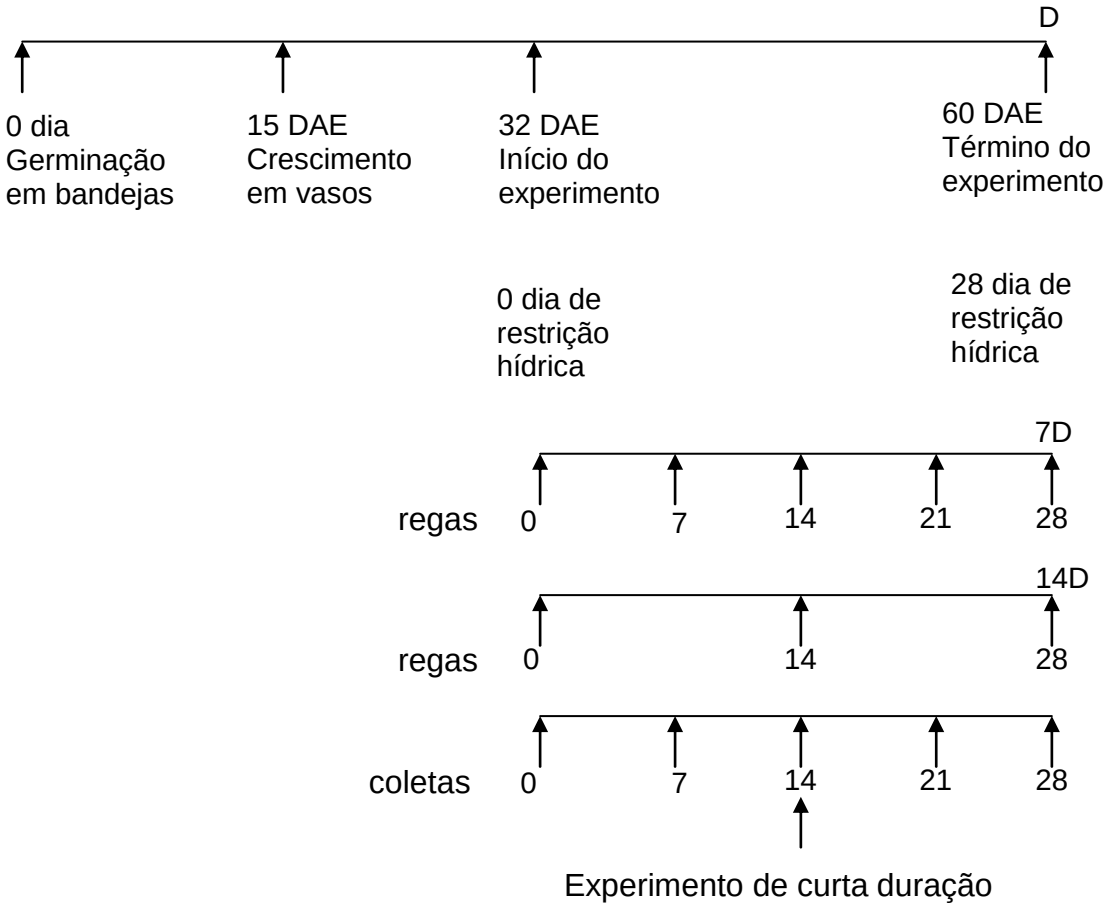

Figura 9. Delineamento do 2º experimento de submissão de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. ao estresse hídrico durante a mobilização do xiloglucano de reserva, realizado em casa de vegetação durante o verão de 2009, a uma temperatura média de 25,2 ^{o}C. D = rega diária (controle), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias. DAE = dias após o início da embebição das sementes.

Outras 5 plântulas foram coletadas aos 32, 39, 46 e 53 DAE para que fossem medidos os pesos fresco e seco de cada órgão (raiz, hipocótilo, epicótilo, cotilédones, eófilos e metáfilos), além dos teores de xiloglucano, de prolina (Bates *et al.* 1973) e de carboidratos solúveis nos cotilédones.

A análise de carboidratos solúveis foi feita segundo Molle *et al.* (2009) com modificações: amostras das partes congeladas das plântulas foram liofilizadas, maceradas, colocadas em eppendorf de 2,0 mL e pesadas. A extração dos açúcares foi feita com 1000 μL de etanol 70%, em banho a 80^0C por 40 minutos, seguida por centrifugação e retirada do sobrenadante. Este procedimento foi repetido cinco vezes, perfazendo 5,0 mL de sobrenadante submetido a posterior secagem em baixa pressão com centrifugação (Hetovac). O material seco foi ressuspendido em 1000 μL de água e o teor de açúcares foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956). Em um tubo de vidro foram acrescentados uma alíquota da amostra a ser dosada e água para um volume final de 0,5 mL, 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico com homogeneização vigorosa, para posterior leitura de absorbância a 490 nm. A quantificação de açúcar foi feita por comparação com curva padrão de glucose.

Os monossacarídeos e oligossacarídeos presentes nas frações de material solúvel em etanol, após nova liofilização, ressuspensão em 1,0 mL de água deionizada e purificação em colunas de troca iônica (utilizando-se as resinas catiônicas e aniônicas Dowex), foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance associada à detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) com coluna Carbo-Pac PA1 em eluição isocrática com NaOH 100 mM por 30 minutos. Os carboidratos foram identificados e quantificados por comparação com os perfis de eluição de padrões comerciais.

Em outras cinco plântulas de cada lote foram feitas medidas de fluorescência da clorofila *a*, em eófilos de plântulas adaptadas ao escuro durante 20 minutos, com o auxílio de um fluorômetro (Mini-PAM 2500, Walz). As plântulas foram mantidas no escuro para que fossem determinados os parâmetros da fluorescência em estado adaptado ao escuro, caracterizado pelo estado em que todos os centros de reação do fotossistema II (FSII) e os aceptores de elétrons do FSII estão re-oxidados (abertos) ou em estado fotoquimicamente inativo. Determinou-se a performance fotossintética em função de níveis crescentes de luz durante 16 min, em oito estádios de 2 min cada um. Ao final de cada nível de luz, aplicou-se um pulso saturante (2.500 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) para a determinação de parâmetros de fluorescência. A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi determinada segundo Lüttge *et al.* (1998).

No experimento de curta duração (figura 9) foi avaliado o efeito do défice hídrico sobre a atividade específica das enzimas de degradação do xiloglucano de reserva nos

cotilédones, β-galactosidase e β-glucosidase, segundo Tiné *et al*. (2000). Para isso, as plântulas foram submetidas às mesmas condições do experimento anterior. Aos 47 DAE, foram feitas coletas dos cotilédones de indivíduos dos 3 lotes a cada 8 horas por dois dias (2, 10 e 18h). Os teores de proteína dos extratos de β-galactosidase e β-glucosidase foram determinados usando 50 μL de extrato enzimático, 750 μL de água e 200 μL de solução de Bradford (BioRad). A absorbância foi determinada a 595nm. A quantidade de proteína foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina bovina sérica.

Também foi avaliado o efeito do défice hídrico sobre a concentração de sacarose nos cotilédones da plântula de *H. courbaril*. As amostras foram congeladas, secas em liofilizador e maceradas. Os metabólitos foram extraídos com solução de metanol:clorofórmio:água (12:5:3 – v/v/v) com 200 μg de fenil-B-D-glucopiranosídeo como padrão interno. Após incubação a 60^0C por 30 minutos, 500 μL de água destilada foram adicionados e o sistema foi centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação a fase superior contendo metanol/água foi separada em outro tubo. Desta solução, 50 μL foram transferidos para tubos de GC-MS (crimp vials), que em seguida foram congelados e liofilizados. Então foi iniciada a derivatização das amostras: foram adicionados 200 μL de piridina e 50 μL de uma mistura de *N,O*-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilsilil-clorosilano (com o auxílio de uma seringa). Após o fechamento hermético dos tubos, as amostras foram incubadas a 75^0C por 30 minutos em um bloco aquecedor. Após este procedimento as amostras derivatizadas estavam prontas para análise no cromatógrafo a gás acoplado a detector de íons seletivo a massas (GC-MS).

Os parâmetros do método utilizado foram os seguintes: a injeção da amostra com volume de três microlitros ocorreu a 200 ^{o}C, a uma pressão de 10,1 psi. O fluxo de amostra na coluna foi de 1,0 mL min^{-1}, a uma pressão de 10,1 psi. A rampa do forno iniciou-se a uma temperatura de 95^{o}C por dois minutos, com aumento de 8^{o}C por minuto até 320^{o}C, com manutenção desta temperatura por dois minutos.

As concentrações de sacarose detectadas pelo GC-MS nos cotilédones nos mesmos horários em que foram feitas as dosagens enzimáticas das hidrolases que participam do desmonte da molécula de xiloglucano foram feitas após a efetuação do teste T. As concentrações de sacarose dos tratamentos 7D e 14D foram comparadas às concentrações das plântulas controle, que foram igualadas a 1.

A análise dos dados em todos os experimentos foi realizada considerando-se a análise de variância (ANOVA), utilizando o Winstat para Excel. O teste de diferença entre as médias foi o "least significant diferences" (LSD) com p = 0,05.

4. Resultados

4.1. Experimento de longa duração (parâmetros fisiológicos e bioquímicos)

Ao longo do período de coletas do experimento de longa duração, os valores do potencial hídrico mantiveram-se relativamente constantes até o 50º dia após o início da embebição das sementes. Já no 53º dia ocorreu diminuição dos valores de potencial hídrico com diferença estatística nas plantas que foram regadas a cada 14 dias em relação às plantas que foram submetidas aos outros tratamentos de rega (D e 7D). Até a quinta coleta, as plântulas submetidas a regas a cada 14 dias passaram a expressar valores ainda mais negativos desse parâmetro ecofisiológico. O potencial hídrico dos epicótilos das plântulas (figura 10A) no início do experimento situavam-se entre zero e -0,5 MPa em todos os tratamentos, mas entre as duas últimas coletas houve um salto para quase -4,0 MPa nas plântulas regadas a cada 14 dias. As plântulas sujeitas a rega semanal mantiveram valores constantes e parecidos com os das plântulas controle (D) durante todo o experimento. Com relação ao teor relativo de água, os eófilos das plântulas apresentavam valores próximos a 90% quando, no período entre as duas últimas coletas, houve uma queda para 60% nas plântulas 14D (figura 10B). Novamente, as plântulas 7D mantiveram valores semelhantes com os das plântulas controle (D) durante todo o experimento.

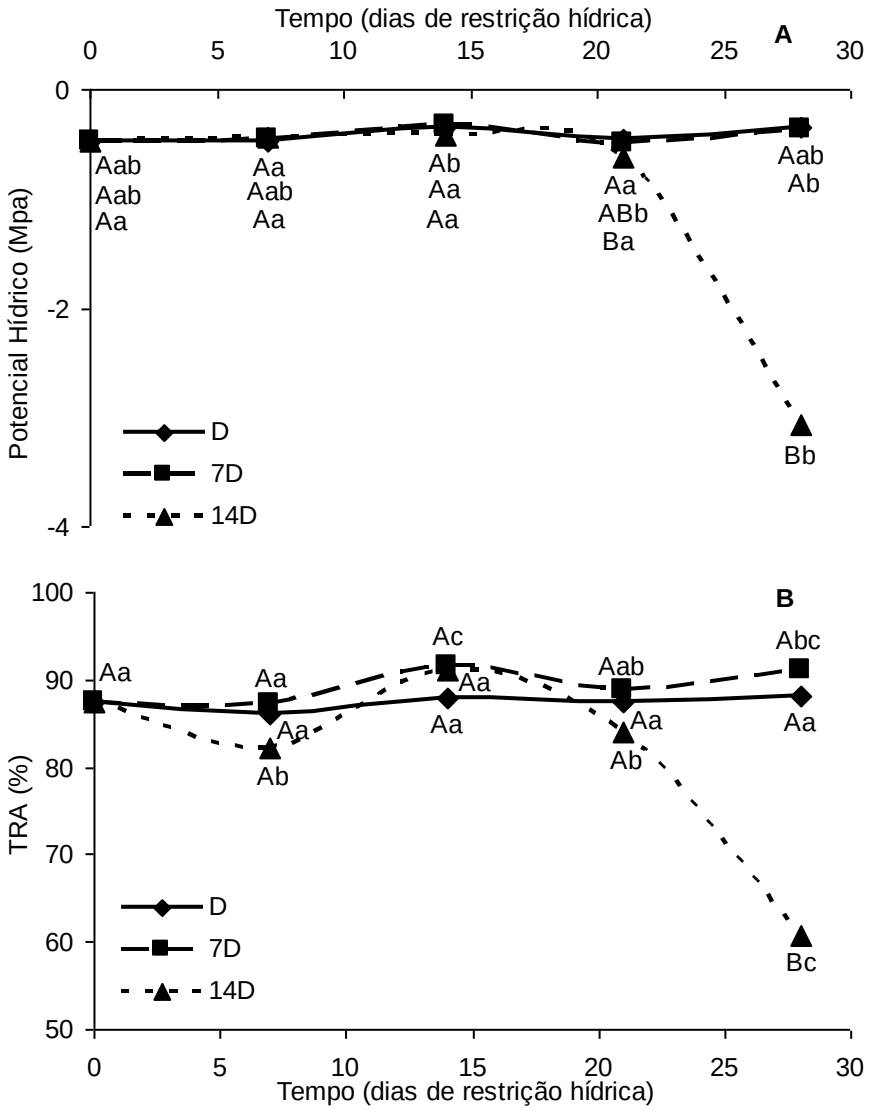

Figura 10: Potencial hídrico (A) de epicótilos e teor relativo de água (B) de eófilos de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (controle), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

A massa seca dos cotilédones (figura 11) não variou de modo significativo nas plantas controle em relação à primeira coleta. Nas plântulas sujeitas ao regime de rega semanal e a cada 14 dias as diferenças estatísticas apareceram já a partir da 2ª coleta em relação à primeira coleta, no 39º dia após a embebição das sementes. Os cotilédones das plântulas 14D atingiram a menor massa em números absolutos somente na 3ª coleta, com diferença estatística significativa entre os tratamentos, após uma queda mais lenta da massa seca do órgão de reserva do que nos outros tratamentos.

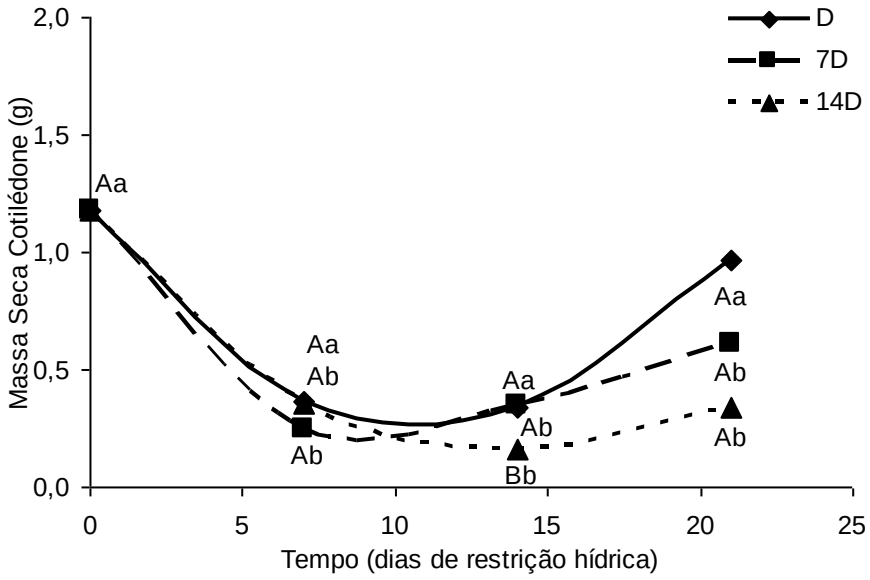

Figura 11. Massa seca dos cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (controle), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

A massa seca das plântulas, resultado da soma da massa seca de todos os órgãos, apresentou queda na 2ª coleta em todos os tratamentos devido à queda da testa da semente (figura 12). A segunda queda da massa seca das plântulas com rega diária e semanal, apresentada a partir da terceira coleta, é decorrente da abscisão dos cotilédones já murchos após a mobilização das reservas. Tal abscisão ainda não havia ocorrido nas plântulas 14D até a 4ª coleta, resultado que alinha-se àquele apresentado anteriormente, referente à lenta queda da massa seca dos cotilédones. Não foi detectada variação na massa seca de raízes, nem diferenças estatísticas entre os tratamentos (dados não mostrados).

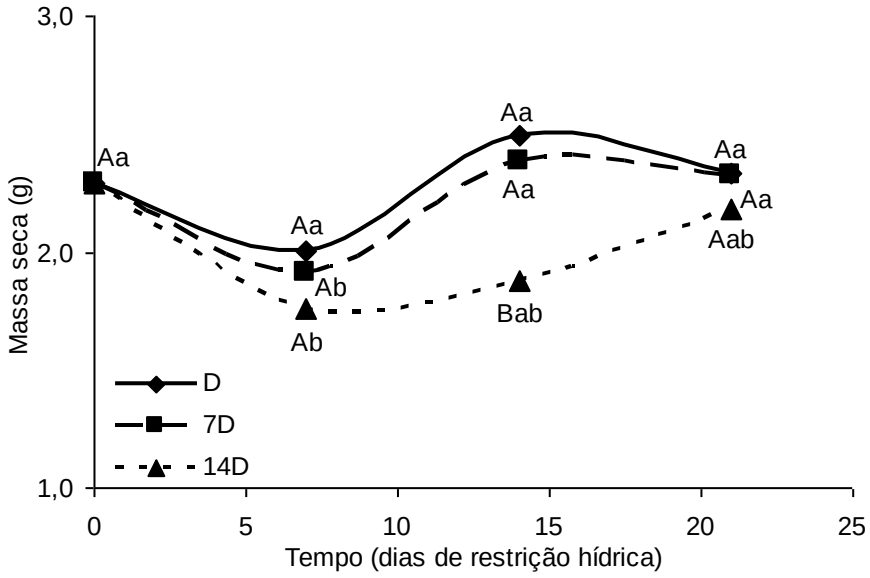

Figura 12. Massa seca (g) das plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. D = rega diária (controle), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias.

Não houve variação da razão raiz:parte aérea entre os tratamentos de rega (figura 13), nem entre os dias de coleta das plântulas controle e das 14D. Houve variação significativa entre as coletas nas plântulas 7D, que mostraram quedas aceleradas na razão entre as 1ª e 2ª coletas e entre as 3ª e 4ª coletas.

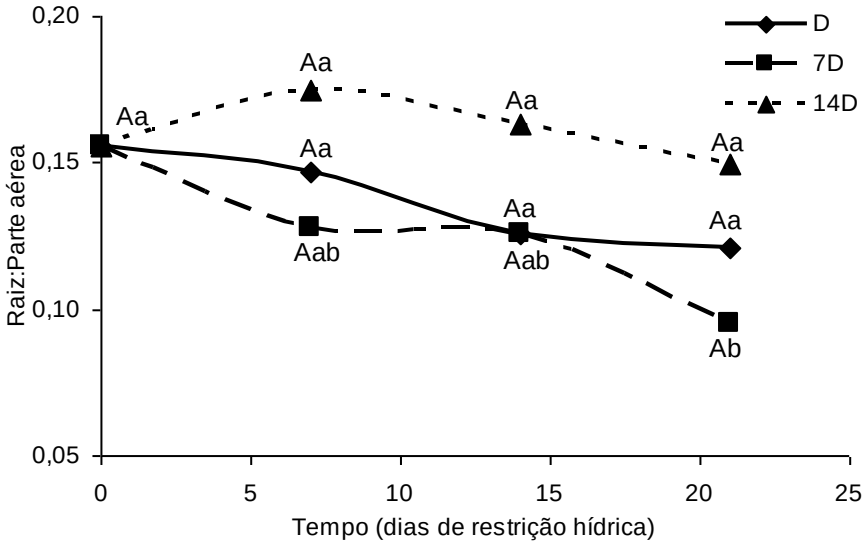

Figura 13. Razão raiz:parte aérea de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

O crescimento da área foliar das plântulas-controle seguiu uma média de 20 cm^2 a cada 7 dias, que é o tempo entre as coletas (figura 14). Entre a 4ª e a 5ª coleta, houve diferenças significativas nas medidas crescentes de área foliar entre os tratamentos de rega. As plântulas sujeitas aos regimes diferenciados de rega (7D e 14D), tiveram o crescimento inibido. Foi observada diferenças estatísticas entre as coletas das plântulas submetidas a rega diária, inclusive nas duas últimas. Nos outros regimes, as diferenças estatísticas entre as duas últimas coletas não foram evidenciadas. As médias das áreas foliares não passaram de 150 cm^2 na 5ª coleta, aproximadamente 25% a menos da média atingida pelas plântulas controle.

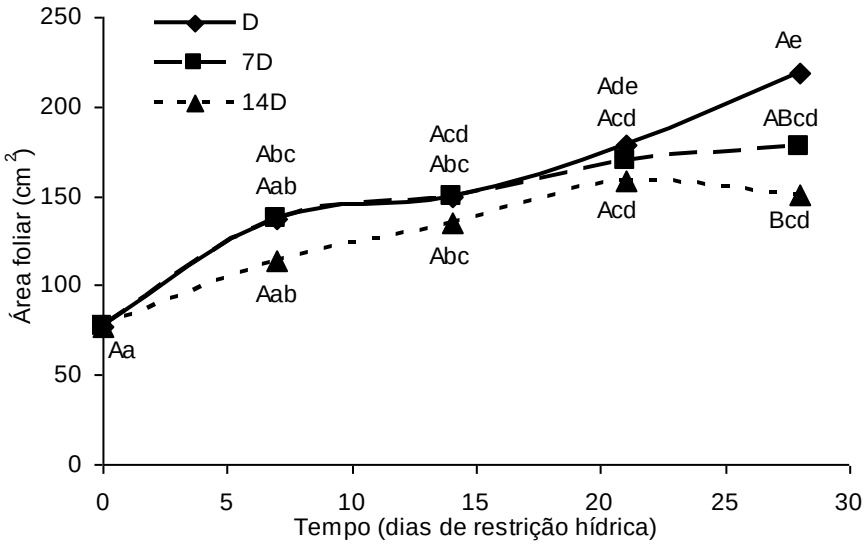

Figura 14. Área foliar (cm^2) de plântulas de *H. courbaril* ao longo da mobilização do xiloglucano de reserva. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

O teor do xiloglucano extraído em água (figura 15) indica a quantidade de polissacarídeo de reserva, ou o teor de xiloglucano, ainda presente nos cotilédones após as extrações etanólicas dos carboidratos solúveis de baixo peso molecular. Foi exibida rapidez pelas plântulas-controle na diminuição do teor de xiloglucano. Não foram encontradas diferenças significativas entre a 2ª e a 4ª coleta pelas plântulas 7D, mas há queda no ritmo de diminuição do rendimento de xiloglucano, em relação às plântulas com rega diária, evidenciada pela diferença estatística na 2ª coleta. Diferenças estatisticamente significativas foram apresentadas pelas plântulas 14D entre as 2ª e 3ª coletas. O rendimento de xiloglucano por massa seca de cotilédone apresentado pelas plântulas submetidas ao défice hídrico severo foi bastante superior àquele exibido pelas plântulas com regas diária e semanal na 2ª coleta. Na coleta seguinte foi atingido o menor valor de teor de xiloglucano pelas plântulas 14D, uma semana depois das plântulas D, ou seja, houve diminuição no ritmo de mobilização das reservas cotiledonares.

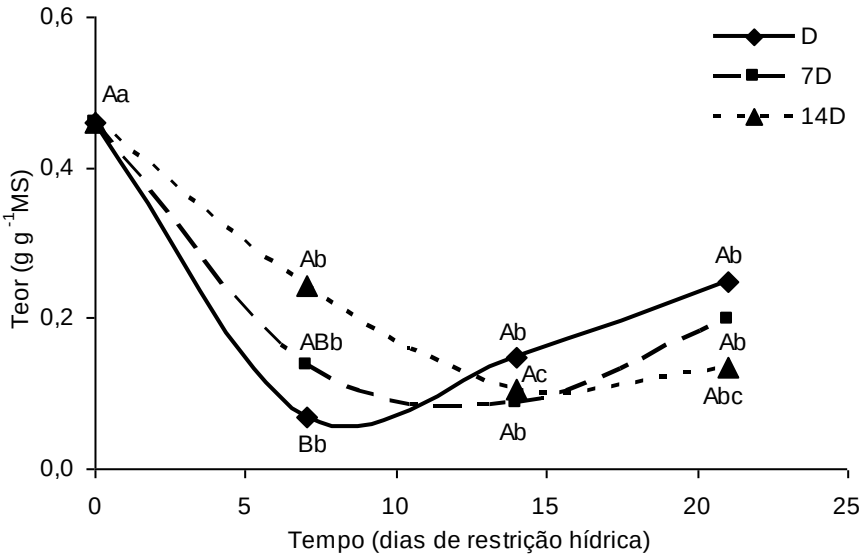

Figura 15: Rendimento do extraído em água dos cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (controle), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

A taxa de transporte de elétrons observada nas plântulas 14D foi menor do que nas plântulas dos outros tratamentos já na segunda coleta (tabela 1). As plântulas com regas semanais obtiveram um acréscimo nos valores na taxa de transporte de elétrons, que permaneceram acima das plântulas controle na 3ª e 4ª coleta. Na última coleta, o elevado valor de ETR máximo das plântulas 14D se deve à exposição acidental à umidade durante o experimento, devido a uma goteira sobre as plântulas 14D que se destinavam especificamente a esse experimento.

Tabela 1: Taxa máxima de transporte de elétrons em eófilos de plântulas de *H. courbaril* ao longo da mobilização do xiloglucano de reserva. D = rega diária (cotrole), 7D = rega a cada 7 dias, 14D = rega a cada quatorze dias. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. C I = 1ª coleta no início da restrição hídrica, C II = 2ª coleta aos sete dias de restrição hídrica, C III = 3ª coleta aos 14 dias de restrição hídrica, C IV = 4ª coleta aos 21 dias de restrição hídrica.

	ETR Máx			
	C I	C II	C III	C IV
D	77,2 ^{Aa}	130,3 ^{Ab}	181,8 ^{Bc}	193,7 ^{ABc}
7D	77,2 ^{Aa}	95,9 ^{Ab}	209,1 ^{Ab}	230 ^{Bb}
14D	77,2 ^{Aa}	90,1 ^{Ac}	159,3 ^{Ab}	196,6 ^{Acd}

Dentre os parâmetros bioquímicos, verificamos a concentração de carboidratos solúveis nos tecidos do parênquima cotiledonar (figura 16). A maior concentração de sacarose nos cotilédones das plântulas-controle ocorreu por volta do 45º dia após o início da embebição, com seguida queda para metade desse valor na coleta seguinte, no 53º DAE.

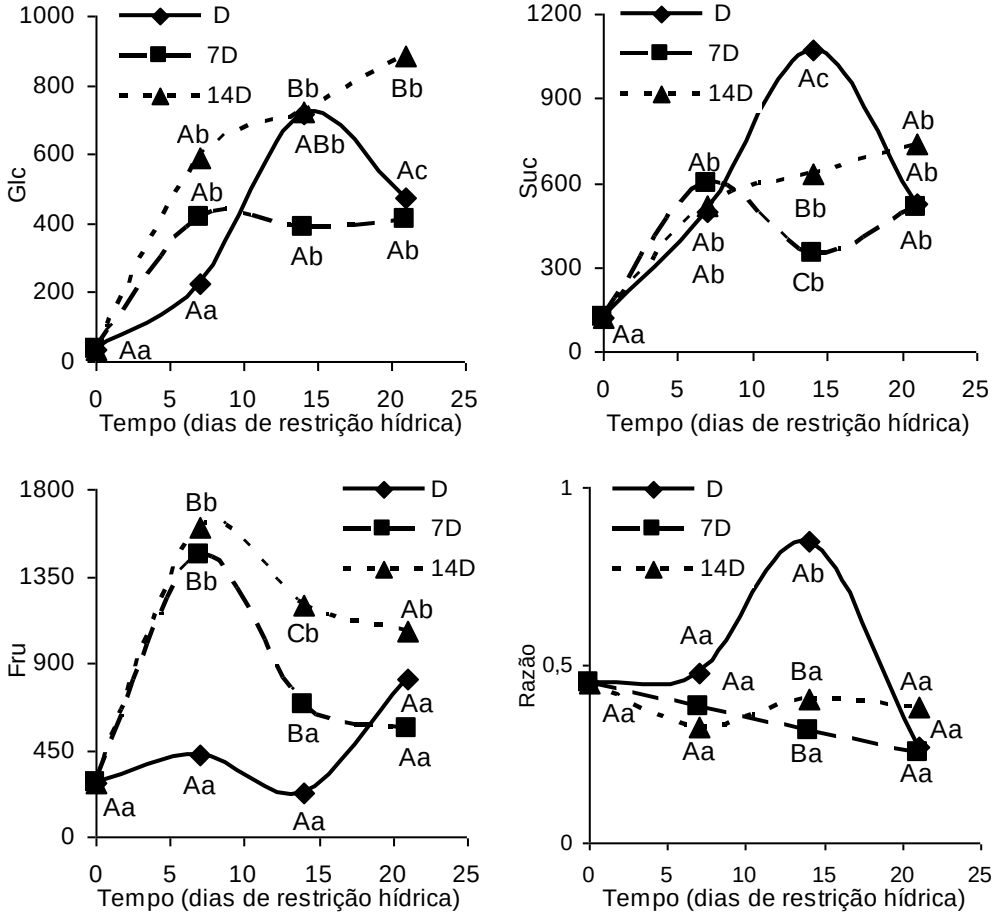

Figura 16. Carboidratos solúveis (μg g^{-1} de massa seca) e razão sacarose:monossacarídeo nos cotilédones de plântulas de *H. courbaril* ao longo da mobilização do xiloglucano de reserva. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p=0,05). (n = 5).

Na 3ª coleta, as concentrações de sacarose foram maiores que as de monossacarídeos nos cotilédones das plântulas-controle, ou seja, sem privação hídrica a sacarose encontra-se pronta para ser exportada, mas nas plântulas sob estresse as concentrações de sacarose foram significativamente menores.

As concentrações de glucose permaneceram entre 400 e 800 μg g^{-1} de massa seca nos 3 tratamentos, com tendência de aumento nas concentrações de glucose a partir da 3ª coleta nas plântulas 14D. Tal tendência foi confirmada na coleta seguinte. Por outro lado, as concentrações de frutose mantiveram-se baixas nas plântulas D, mas nos outros tratamentos foram aferidos valores aproximadamente três vezes maiores na 2ª coleta. Na 3ª coleta foi observada diminuição na concentração de frutose mais rápida nas plântulas 7D do que nas plântulas14D. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos de rega na última coleta.

Dessa maneira, a razão sacarose:monossacarídeos foi mais próximo de 1 no período compreendido como auge da mobilização do xiloglucano e máxima concentração de sacarose nos cotilédones para exportação (3ª coleta) das plântulas D, com diferenças estatísticas relevantes em relação as plântulas sujeitas aos estresses moderado e severo. Nas plântulas 7D e 14D esta razão não passou de 0,5 durante o período de coletas, sem mudanças significativas nem entre os dias de coletas, nem entre os tratamentos.

A concentração de prolina foi outro parâmetro bioquímico avaliado no parênquima cotiledonar de plântulas de *H. courbaril* (figura 17). As altas concentrações desse aminoácido observadas na 1ª coleta ocorrem devido à presença dos corpos protéicos no início da mobilização do xiloglucano de reserva. À medida que o polissacarídeo é digerido através da atividade das hidrolases, os corpos protéicos e, consequentemente, o conteúdo de prolina diminui. Entretanto, ao final da mobilização, os dados já não apresentam a interferência deste artefato, e no 53º dia após o início da embebição ocorre uma tendência de incremento da concentração de prolina nas plântulas 14D, em relação à da 3ª coleta. Inversamente, nas plântulas D e 7D foi observada uma tendência na diminuição da concentração deste aminoácido, utilizado para o ajustamento osmótico das células de indivíduos com restrição hídrica, assim como os monossacarídeos glucose e frutose. Diferenças estatísticas entre os regimes de rega não foram observadas durante as coletas.

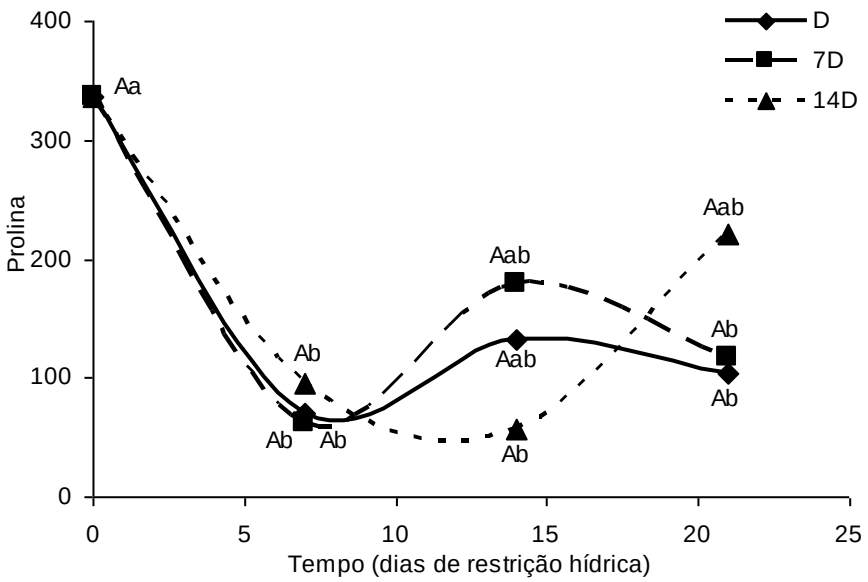

Figura 17. Concentração de prolina (μg g^{-1} de massa seca) nos cotilédones de plântulas de *H. courbaril* ao longo da mobilização do xiloglucano de reserva. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

4.2. Experimento de curta duração (atividades enzimáticas)

A atividade específica das enzimas que participam do desmonte da molécula de xiloglucano de reserva, no período compreendido como auge da mobilização (3ª coleta do experimento I), variou pouco, principalmente nas plântulas 14D. Neste lote houve variação negativa na atividade de β-galactosidase apenas nas 18 e 2 horas no segundo dia de coleta (figura 18A). Nas plântulas 7D não foram observadas modificações na atividade de β-galactosidase (figura 18A) durante a madrugada entre o 1º e o 2º dia de coletas. As plântulas controle apresentaram maior atividade às 10 horas da manhã nos 2 dias de coleta, logo seguida por queda no horário seguinte. Em todos os tratamentos houve queda significativa no último ponto de coleta, às 2 horas da manhã.

As atividades de β-glucosidase (figura 18B) foram maiores às 10 horas dos dois dias nas plântulas D, sendo que na última coleta às 2 horas da manhã a atividade foi metade daquela apresentada às 10 horas da manhã anterior. Os cotilédones das plântulas 7D apresentaram menores atividades de β-glucosidase às 18 horas do primeiro dia, com elevação da atividade no dia seguinte seguida de queda novamente às 18 horas. Não houve variação na atividade de β-glucosidase nas plântulas 14D (figura 18B). As plântulas 14D sempre apresentaram atividade menor que as plântulas controle. Em todos os tratamentos as atividades das enzimas foram maiores às 10 horas, ou no segundo dia ou em ambos, seguida de queda de atividade no horário seguinte. Diferenças estatísticas entre os tratamentos de rega não foram observados em nenhuma das atividades específicas de ambas enzimas.

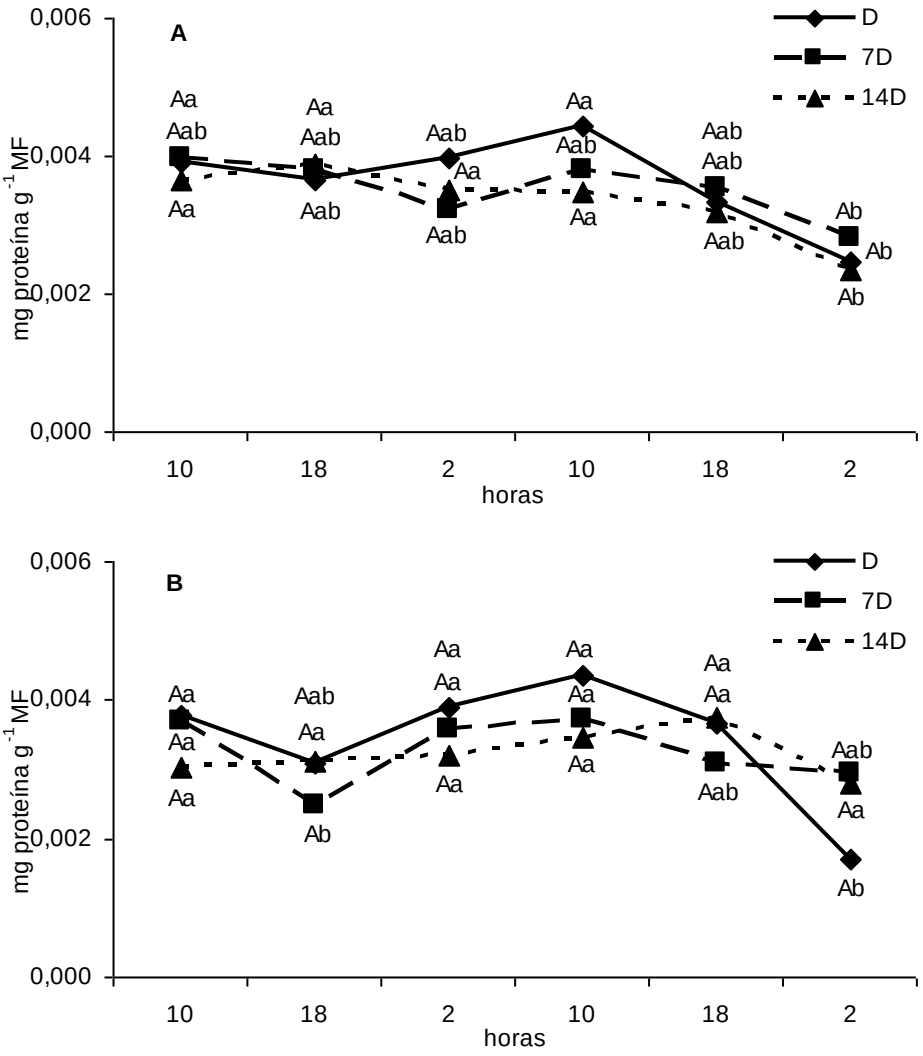

Figura 18. Atividade específica das hidrolases de mobilização de xiloglucano de reserva de cotilédones de plântulas de *H. courbaril* L. submetidas aos três diferentes regimes de regas. A = β-galactosidase, B = β-glucosidase. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

Quando as atividades da β-galactosidase são expressas por grama de matéria fresca de cotilédones (figura 19A), grandes variações no segundo dia de coleta foram observadas nos dados das plântulas sem restrição hídrica, com os maiores resultados apresentados às 10 horas do 2º dia de coleta, e os menores na coleta seguinte, às 18 horas do segundo dia de coleta.

Foram observadas baixas atividades durante a madrugada entre os dias de coleta nas plântulas 7D. Nas plântulas 14D, foram observadas atividades mais altas de β-galactosidase no 1º dia de coleta que no 2º.

Variações parecidas com as descritas acima foram observadas com as atividades de β-glucosidase por grama de matéria fresca dos cotilédones (figura 19B), no lote das plântulas-controle. As variações relevantes foram evidenciadas no 2º dia de coleta, com alta atividade às 10 horas seguida de diminuição nos horários seguintes. Não foram observadas variações significativas nas atividades enzimáticas das plântulas 7D entre os horários das coletas. Às 2 horas da manhã do 1º dia foi observada a maior atividade enzimática das plântulas 14D. No mesmo horário do dia seguinte foi observada a menor atividade enzimática deste lote.

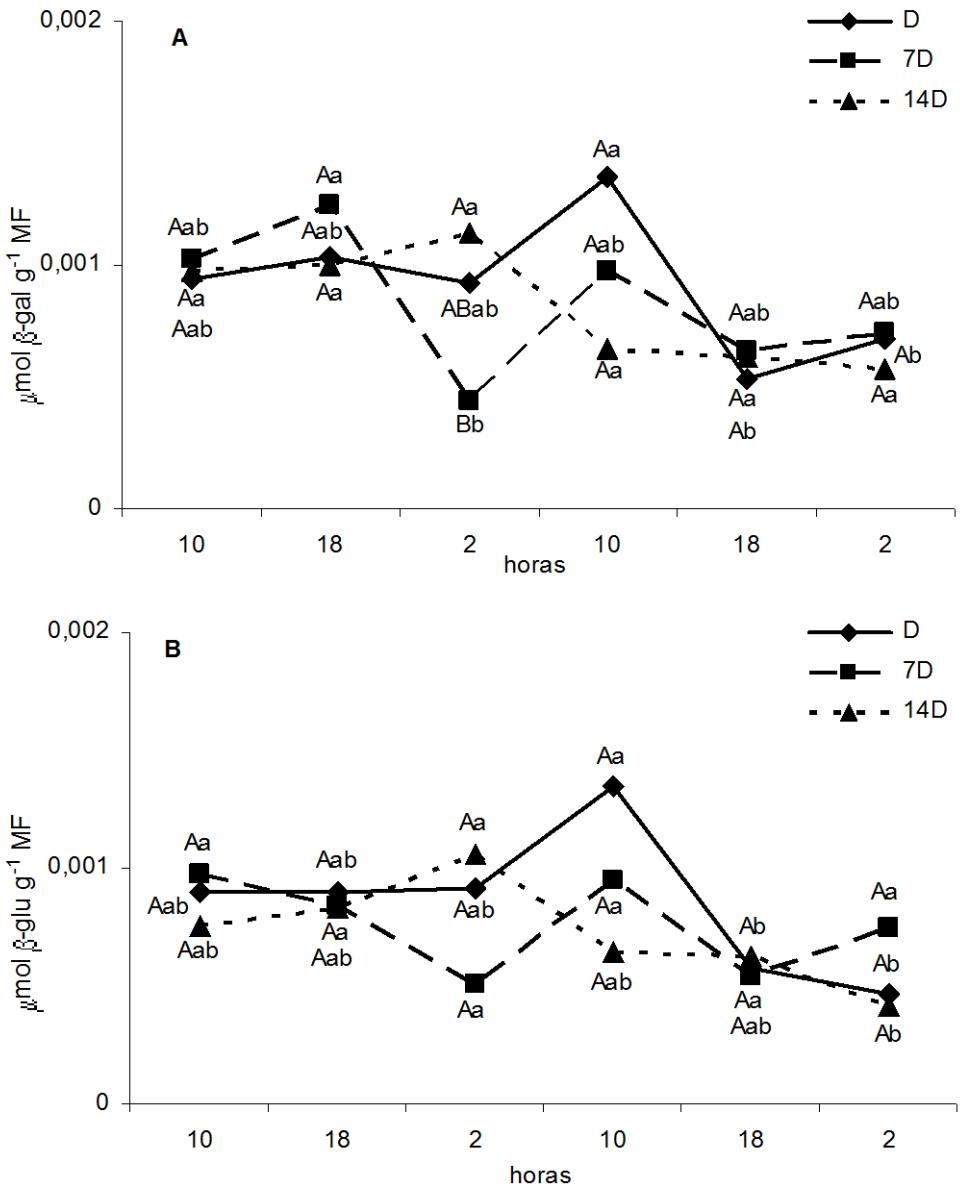

Figura 19. Atividade por grama de matéria fresca das hidrolases de mobilização de xiloglucano de reserva de cotilédones de plântulas de *H. courbaril* L. submetidas aos três diferentes regimes de regas. A = β-galactosidase, B = β-glucosidase. Letras maiúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos de rega. Letras minúsculas diferentes correspondem a diferenças significativas entre os dias de coleta. (p = 0,05). (n = 5).

As concentrações de sacarose detectadas pelo GC-MS nos cotilédones nos mesmos horários em que foram feitas as dosagens enzimáticas das hidrolases que participam do desmonte da molécula de xiloglucano são mostradas na figura 20. Às 10 horas da manhã do primeiro e do segundo dia de coleta, a concentração de sacarose encontrada nos cotilédones das plântulas 14D é aproximadamente três vezes maior que a encontrada nas plântulas controle. As plântulas 7D também apresentam mais que o dobro de concentração de sacarose, em relação às plântulas controle, mas somente no 2º dia. Nos demais horários, as concentrações de sacarose nos cotilédones das plântulas 7D e 14D são ligeiramente menores que as das plântulas-controle.

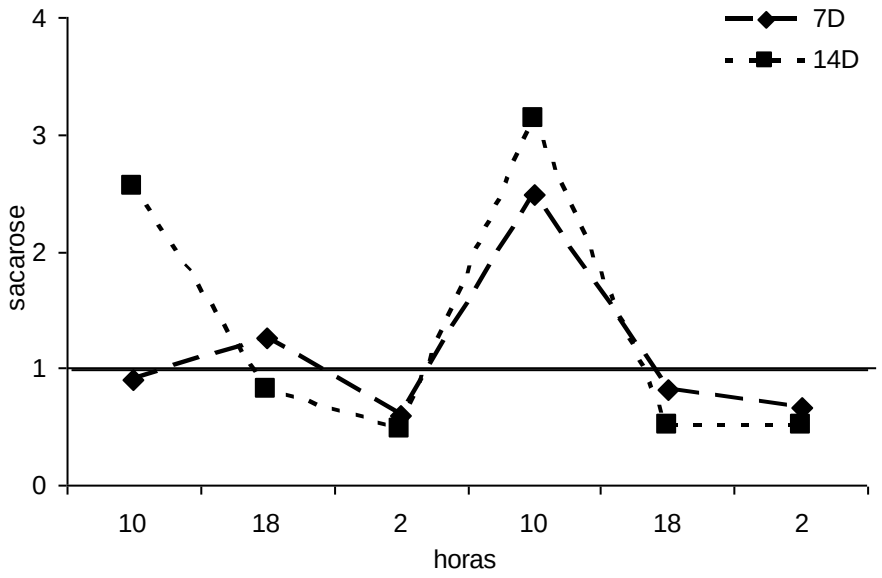

Figura 20. Teor de sacarose de cotilédones de plântulas de *H. courbaril* L. submetidas a rega semanal (7D) e a cada 14 dias em relação aquelas submetidas a rega diária (controle) (n=5).

A análise dos componentes principais do perfil metabólico de cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* submetidas a regimes diferenciados de regas (figura 21), mostrou que no horário em que ocorre o auge da fotossíntese (10 horas) os perfis das plântulas dos diferentes lotes divergem, ao passo que nos horários de 18 e 2 horas os perfis convergem para pontos bastante semelhantes. Cada ponto do gráfico representa uma plântula.

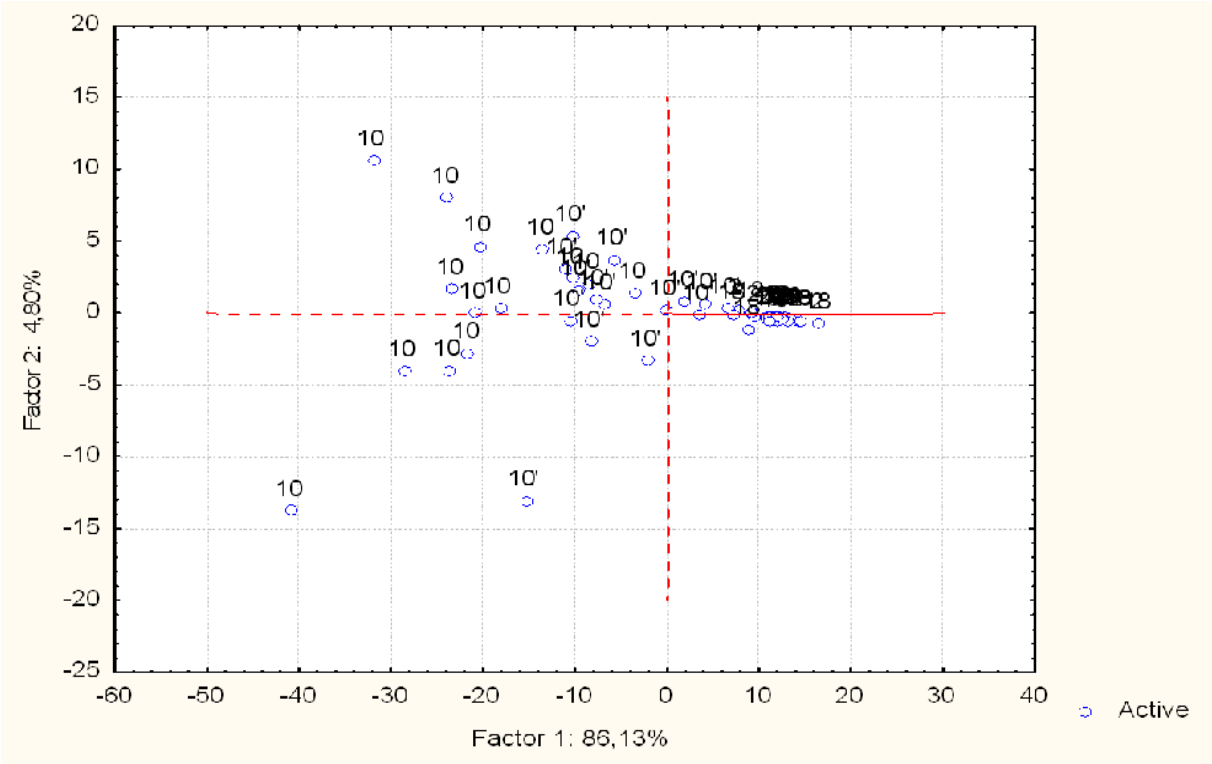

Figura 21. Análise de componentes principais do perfil metabólico de cotilédones de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. submetidas a regimes diferenciados de regas. Cada ponto do gráfico representa uma plântula.

5. Discussão

5.1. Experimento de longa duração (parâmetros fisiológicos e bioquímicos)

A constância nos valores do potencial hídrico dos epicótilos (figura 10A) e do teor relativo de água dos eófilos (figura 10B), até por volta do 53º dia após o início da embebição das sementes, nas plântulas com severa restrição hídrica (14D), indica a tolerância da plântula de *Hymenaea courbaril* L. ao estresse hídrico, originado após imposição de um défice hídrico, através da restrição por suspensão da irrigação.

Nos estudos de Thomas & Gausling (2000), as plântulas de *Quercus petraea* e *Quercus robur* submetidas a um estresse hídrico moderado durante 3 meses, apresentaram resultados estatisticamente distintos daqueles do início do tratamento 50 dias depois. Porém, o potencial hídrico foi mensurado de folhas, com valores por volta de -1,0 MPa no auge do défice hídrico. Em outro experimento (Lebourgeois *et al.*, 1998), com plântulas de 2 variedades de *Pinus nigra*, os menores valores de potencial hídrico foliar, foram de aproximadamente -2,5 MPa, próximo de valores que induzem a cavitação do xilema. Em ambos os experimentos foram utilizados como modelos biológicos espécies adaptadas ao clima mediterrâneo, com verões quentes e secos, mas que naturalmente não ocorrem em regiões com outros climas, como *Hymenaea courbaril* L.

O teor relativo de água de folhas de plantas de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) com 1 ano de idade, submetidas a 14 dias de suspensão de regas, teve média de 61,8% (Queiroz *et al.*, 2002). Ao compararmos os resultados dessa espécie arbórea, adaptada à sobrevivência em locais onde há ocorrência de seca anual pronunciada, com os de nosso experimento, torna-se evidente a adaptação de *Hymenaea courbaril* L. à sobrevivência durante seu crítico período de estabelecimento tanto em biomas com altos índices pluviométricos bem distribuídos anualmente, quanto naqueles com disponibilidade hídrica menor, associados a períodos de seca.

O fato da massa seca dos cotilédones ter apresentado queda mais lenta nas plântulas 14D do que nos outros tratamentos (figura 11), sugere que, durante o tratamento, a taxa de mobilização das reservas foi reduzida. Aparentemente, durante o estresse, a mobilização das reservas é reduzida, e não aumentada como esperado diante da redução da fotossíntese. Em resposta ao estresse, a taxa de crescimento é diminuída, o que reduz a demanda energética. Este mecanismo aumenta o tempo que a plântula sobreviveria durante um período de estresse até que as condições ideais de crescimento fossem reestabelecidas.

Tal resultado é corroborado com aquele referente ao de massa seca total (figura 12). O desenvolvimento das plântulas com rega semanal foi semelhante ao das plântulas-controle, o que sugere que a fotossíntese está estabelecida e, portanto, as duas fontes de carbono estão atuando sobre o desenvolvimento das plântulas 7D assim como as D. As plântulas de ambos os lotes mobilizam as reservas cotiledonares para o desenvolvimento da parte aérea (Santos *et al.*, 2004).

Porém, as plântulas 14D tiveram um crescimento mais lento e inferior ao das plântulas dos outros lotes ao final do período de coletas, sugerindo que a única fonte de carbono para elas é a mobilização das reservas dos cotilédones, que ocorre de maneira mais lenta, fato evidenciado pela diminuição mais demorada da massa seca dos cotilédones, que ainda não haviam sofrido abscisão das plântulas na quarta coleta. Isso corrobora o modelo segundo o qual, diante de um défice hídrico severo, a plântula reduz sua taxa de crescimento e a mobilização das reservas, o que maximiza suas chances de sobreviver a um período de adversidade.

Segundo Callaway e colaboradores (2003), plantas alocam biomassa nas raízes em ambientes pobres em nutrientes e em água, como resposta para maximizar as habilidades competitivas dos indivíduos submetidos ao défice hídrico. De fato, Santos & Buckeridge (2004) mostraram que o sistema radicular é o segundo maior dreno de carbono em plântulas de *H. courbaril*, depois da parte aérea. Porém, a imposição de um défice hídrico pode favorecer uma mudança nas relações fonte-dreno de carboidratos. Sob tais condições, o ABA endógeno pode exercer efeito positivo no crescimento da raiz, influenciando, por exemplo, o aumento de atividade da invertase vacuolar nos tecidos deste órgão (Troverie *et al.*, 2003), enzima reconhecida pela capacidade de aumentar a força de dreno de sacarose nas células (Molle *et al.*, 2009). Dessa maneira, o sistema radicular pode tornar-se um dreno mais vigoroso de carboidratos, a ponto de efetuar a manutenção ou acréscimo de sua massa seca, em detrimento da força de dreno na parte aérea, que de fato possui um crescimento bem mais lento nas plântulas 14D.

Os resultados de área foliar (figura 14) são tão dramáticos quanto os obtidos por Engelbrecht & Kursar (2003): dentre várias espécies tropicais estudadas, todos os indivíduos que sobreviveram ao défice hídrico imposto tiveram diminuição no aumento da área foliar em relação às que foram irrigadas. Essa redução foi de aproximadamente de 60% em indivíduos de *H. courbaril* L. com 20 semanas de idade, portanto, já estabelecidas. Tal resultado é parecido com os de nosso experimento, apesar de nossas plântulas serem mais jovens e ainda se apresentarem em processo de estabelecimento, o que pode ser mais crítico para a sobrevivência delas.

Assim, a redução nas taxas de desenvolvimento da área foliar nas plântulas submetidas tanto ao défice hídrico moderado quanto ao severo, é causada pela utilização das reservas para a sobrevivência das plântulas, em detrimento do desenvolvimento da parte aérea. Tal desenvolvimento acontece de maneira plena nas plântulas-controle (figura 14), de acordo com os mecanismos de mobilização do xiloglucano de reserva (Tiné *et al.*, 2000), e de distribuição de carboidratos de acordo com as relações fonte-dreno de sacarose (Santos & Buckeridge, 2004; Molle *et al.*, 2009). Uma das consequências do subdesenvolvimento da parte aérea é a diminuição da área sujeita à perda de água para o ambiente através da transpiração, uma das principais demandas por água que as plântulas possuem, ao lado da fotossíntese (Fan *et al.*, 2006).

Dentre os parâmetros discutidos até agora, o comportamento das plântulas 7D assemelhou-se com aquele apresentado pelas plântulas D. Quando fazemos a comparação da área foliar entre os lotes com diferentes regimes de rega (figura 14), finalmente as plântulas 7D exibem resultados típicos de plântulas estressadas, que se assemelham bastante com os resultados concernentes às plântulas 14D. A inibição do crescimento aliado à conseqüente redução da área foliar sujeita à transpiração são determinantes para o prolongamento da sobrevivência das plântulas estressadas.

Outra clara indicação da diminuição no ritmo de mobilização das reservas cotiledonares de plântulas de *Hymenaea courbaril* L. sob défice hídrico, é a atenuada diminuição do teor de xiloglucano nos cotilédones das plântulas 7D e 14D ao longo do experimento (figura 15). A mobilização mais lenta das reservas cotiledonares significa crescimento mais lento das plântulas 14D, o que acarreta um tempo mais prolongado de sobrevivência delas apenas utilizando-se das reservas, única fonte de carbono para a plântula nessa situação de estresse.

O nível de desidratação imposto às plântulas de *H. courbaril* levou à redução da taxa máxima de transporte de elétrons (tabela 1). Quando este parâmetro é observado nas plântulas com restrição hídrica rigorosa, percebe-se os menores valores, mesmo com pequena diminuição do teor relativo de água, como aconteceu com as plântulas 14D. Após a reidratação acidental das plântulas 14D antes da 4ª coleta, houve recuperação da taxa máxima do transporte de elétrons, o que demonstra que, apesar de severo, o défice hídrico não provocou danos permanentes nos centros de reação do fotossistema II. Caso houvesse tais danos, haveria inibição da fotossíntese, segundo estudos feitos em oliveiras (Angelopoulos *et al.*, 1996).

A alta concentração de sacarose nas plântulas controle observada entre o 46º e o 53º dias após o início da embebição (figura 16) coincide com o auge da mobilização do

xiloglucano de reserva, que é degradado até a formação da sacarose, seguida de sua exportação para os tecidos-dreno da plântula de *H. courbaril* L. (Tiné *et al.*, 2000; Molle *et al.*, 2009). A presença de grandes quantidades de sacarose geralmente indica que há alguma fonte de energia importante em ação na planta (Buckeridge *et al.*, 2004). No caso das plântulas D, a fonte de energia pode ser o cotilédone durante a noite ou os eófilos durante o dia. As concentrações menores dos monossacarídeos no cotilédone dão força ao fato de que a glucose e frutose originadas da mobilização do xiloglucano de reserva já seriam transformadas em sacarose, para imediata exportação, ou em amido transitório, que funciona como um "tampão" de carboidratos, evitando o aumento excessivo da concentração citoplasmática de monossacarídeos (Tiné, 1997).

Nos dados de concentração de carboidratos solúveis (figura 16) foram observados que as plântulas submetidas a regas semanais (7D) obtiveram resultados mais próximos de 14D do que de D, assim como nos dados de área foliar. Isso mostra que, do ponto de vista bioquímico, as plântulas 7D estavam reagindo ao estresse, embora isso não se reflita nos dados de crescimento. Ou seja, as plantas estavam se aclimatando bioquimicamente ao estresse.

As concentrações de sacarose no modo "não exportação de sacarose", observadas nas plântulas 7D e 14D, são muito mais baixas que as encontradas nos cotilédones das plântulas-controle, que estão exportando o dissacarídeo para os órgãos dreno. As concentrações de monossacarídeos são maiores nos cotilédones das plântulas estressadas porque tanto a glucose como a frutose são solutos orgânicos de pequenas massas moleculares que podem estar envolvidos no ajuste osmótico celular. Concentrações celulares maiores desses monossacarídeos fazem com que a saída de água da célula seja bem mais difícil em caso de estresse hídrico. Na literatura são citados mecanismos de aumento na degradação de sacarose. O incremento da atividade de invertase vacuolar é o mais citado, sendo relacionado com o aumento das concentrações de ácido abscísico (ABA) que aumenta o nível de transcrito Ivr2 que codifica uma invertase vacuolar (Troverie *et al.*, 2003). Existem estudos sobre a modulação diurna da expressão e a especificidade órgão/tecido desse transcrito (Kim et al., 2000a). Pelleschi e colaboradores (1997) citam a alta atividade da invertase vacuolar sem alteração na atividade de invertase alcalina, e diminuição da síntese de sacarose, através da queda da atividade da sacarose fosfato sintase, em virtude do decréscimo da entrada do CO_2 em folhas maduras de plantas de milho submetidas ao estresse hídrico, devido ao fechamento estomático. Então, é possível que uma parte da sacarose, devido ao défice hídrico imposto às plântulas 7D e 14D, deixe de ser sintetizada nos cotilédones, em virtude da queda de atividade da sacarose fosfato sintase.

O aminoácido prolina, assim como os monossacarídeos, também é um soluto orgânico de massa molecular reduzida também envolvido no ajuste osmótico celular. A tendência de aumento das concentrações desse aminoácido a partir do 46º dia após o início da embebição nas plântulas 14D é outro indicativo do estresse hídrico imposto a elas (figura 17). A ocorrência de tal evento não foi observada nas plântulas 7D, que apresentou resultados semelhantes aos das plântulas-controle. Na literatura há estudos sobre a atividade de biossíntese de prolina realizada pela sintetase de glutamina. Plantas mutantes para essa enzima acumulam menos prolina do que tipos selvagens, quando ambas são submetidas ao défice hídrico (Díaz *et al.*, 2010).

Em outra abordagem, um grupo de genes denominados P5CS é responsável pela codificação da enzima que promove o primeiro passo da via de biossíntese da prolina: sintetase de Δ-1-pirrolina-5-carboxilato. As enzimas P5CS são isoformas que possuem funções não redundantes. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene *AtP5CS1* é expresso em várias células, exceto naquelas em divisão. O gene *AtP5CS2* é expresso somente em células em rápida divisão. Ambos são induzidos principalmente pela seca, porém P5CS1 é insuficiente para compensar os efeitos causados pela inativação do P5CS2 (Székely *et al.*, 2008). Há outros relatos de acúmulo deste aminoácido de forma a favorecer a aclimatação e/ou adaptação das plantas ao défice hídrico imposto (Nayyar & Walia 2003; Yamada *et al.*, 2005; Garcia, 2009).

5.2. Experimento de curta duração (atividades enzimáticas)

As atividades enzimáticas das plântulas controle apresentaram um perfil distinto daquelas apresentadas por Amaral (2005). A atividade mais alta da enzima β-glucosidase por massa seca das plântulas controle (figura 19B) teve um atraso de 8 horas em relação à atividade apresentada na literatura. Este atraso é maior que o intervalo entre o acúmulo de RNAm desta enzima e sua atividade que é de 6 horas (Brandão *et al.*, 2009), o que torna o panorama ainda mais complexo.

As atividades específicas das plântulas controle, são as que apresentam as maiores variações entre os horários de coleta, ao passo que as atividades específicas das plântulas regadas a cada 14D são praticamente lineares (figuras 18A e B). Esse dado é indicativo de que quando a fotossíntese não é fonte primária e principal de carbono para a plântula, as variações diárias da mobilização das reservas cotiledonares, a outra fonte de carbono para a plântula, passa a inexistir. Com a inibição da fotossíntese, as reservas passam a ser a única fonte de

carbono e são mobilizadas de forma uniforme ao longo do dia. Esse fato é especialmente claro quando observamos a atividade específica da β-glucosidase nos cotilédones das plântulas regadas a cada 14 dias (figura 18B).

A constância das atividades das hidrolases ao longo do dia é necessária para as plântulas 14D porque a redução do crescimento, principalmente das folhas que deveriam estar se expandindo, pode acarretar num outro tipo de estresse comum para as plântulas, que possuem como habitat o solo sombreado da floresta: o estresse por falta de luz.

A luz, mesmo difusa, promove o crescimento da parte aérea, local de biossíntese do ácido indol-acético, que modula a expressão de genes que codificam as enzimas de parede celular, responsáveis pela degradação do polissacarídeo de reserva (Santos *et al.*, 2004). Com o desenvolvimento da parte aérea diminuído, existe a possibilidade de que a biossíntese da auxina também esteja inibida, afetando a expressão dos genes codificadores das hidrolases, o que acarreta na diminuição do ritmo de degradação do xiloglucano. Este fato favorece a pouca variação da atividade da β-galactosidase e da β-glucosidase, em virtude da inibição da fotossíntese causada pelo fechamento estomático induzido pelo défice hídrico.

A ausência de variação também foi observada nas concentrações de carboidratos solúveis (figura 16). Embora os dados estejam expressos em outra escala de tempo, as concentrações de sacarose, frutose e glucose, além da razão sacarose:monosacarídeo, tendem a permanecerem inalteradas desde a segunda coleta nas plântulas 14D. Esse fato, juntamente com as quedas lentas da massa seca dos cotilédones (figura 11) e do rendimento de xiloglucano extraído em água (figura 15) corroboram essa teoria.

Após o pico de concentração de sacarose nos cotilédones das plântulas 14D em relação às plântulas D (figura 20), ocorre a exportação maciça de sacarose para os órgãos dreno da plântula, de forma que no horário seguinte de coleta (18 horas), a concentração de sacarose já está abaixo daquela encontrada nas plântulas-controle, e assim se mantem durante a madrugada. Posteriormente, o valor ascende em comparação ao controle de novo às 10 horas. Assim, a demanda energética, caracterizada pela mobilização das reservas e exportação da sacarose dos cotilédones para os órgãos-dreno, parece ter sido transferida para o período diurno nas plântulas estressadas, em substituição da fotossíntese que nelas encontra-se deprimida.

Às 10 horas, horário do auge da assimilação de carbono pela fotossíntese, os perfis metabólicos das plântulas mostrados na análise dos componentes principais (figura 21) divergem, porque a restrição hídrica é um fator que influencia sobremaneira o comportamento fotossintético, devido ao fechamento estomático naquelas plântulas submetidas a um défice hídrico severo. Nos horários em que a fotossíntese não ocorre (18 e 2 horas), o perfil

metabólico das plântulas converge para pontos muito próximos, o que é indicativo de que o metabolismo de mobilização das reservas cotiledonares é menos suscetível à restrição hídrica do que a fotossíntese, o que garante para as plântulas que tentam se estabelecer em ambientes com condições hídricas adversas, maior possibilidade de sucesso ao aproveitar o carbono proveniente da mobilização do xiloglucano de reserva, que está sendo desmontado neste momento para que haja exportação de carbono via sacarose no horário da fotossíntese (figura 20).

6. Conclusões

O padrão de crescimento das plântulas de *Hymenaea courbaril* foi alterado pela imposição do estresse hídrico. Não houve reprodução do padrão quantitativo na utilização das reservas das plântulas de *Hymenaea courbaril* L., como descrito na literatura. Houve uma mudança qualitativa, naquelas submetidas ao estresse hídrico. A única fonte de reserva (cotilédones) deixa de exportar sacarose durante a madrugada, passando a exportá-la durante o dia.

A taxa de crescimento das plântulas foi reduzida, o que reduz a demanda energética e aumenta o tempo de disponibilidade para plântula das reservas cotiledonares. A diminuição das taxas de crescimento da plântula e de transporte de elétrons nos eófilos, induzida pela imposição de défices hídricos moderado (rega a cada 7 dias) e intenso (rega a cada 14 dias), modifica a mobilização do xiloglucano de reserva dos cotilédones, tornando-a constante ao longo do dia.

7. Referências Bibliográficas

Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjovall-Larsen, S.S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U. & Kjellbom, P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. Plant Molecular Biology, 59: 469-484.

Amaral, L. M. V. 2005. Metabolismo de carboidratos estruturais e de reserva em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. (JATOBÁ). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo 123p.

Angelopoulos, K., Dichio, B., Xiloyannis, C. 1996. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. Journal of Experimental Botany, 47: 1093-1100.

Asseng, S., Ritchie, J.T., Smucker, A.J.M. & Robertson, M.J. 1998. Root growth and water uptake during water deficit and recovering in wheat. Plant and Soil, 201**:** 265–273.

Barriga, M. L. 2003. Fitomonitoração e modelagem de fotossíntese em jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) com redes neurais artificiais. Tese (Doutorado) - ESC POLITECNICA, Universidade de São Paulo, São Paulo, 188 p.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

Bohnert, H. J., Nelson, D. E., Jensen, R. G. 1995. Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell, 7: 1099-1111.

Brandão, A.D., Del Bem, L.E.V., Vincentz, M., Buckeridge, M.S. 2009. Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization-related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. Journal of Experimental Botany, 60 (4): 1191-1206.

Buckeridge, M. S., Aidar, M. P. M., Santos, H. P., Tiné, M. A. S. 2004. Acúmulo de reserva. In: Ferreira, A. G. & Borghetti, F. (orgs.). Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre. 31-50.

Buckeridge, M. S. & Reid, J. S. G. 1996. Major cell wall storage polyssacharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. Ciência e Cultura, 48: 153-162.

Buckeridge, M. S., Rocha, D. C., Reid, J. S. G. & Dietrich, S. M. C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savana and forest populations. Physiologia Plantarum, 86: 145-151.

Buckeridge, M. S., Tiné, M. A. S., Santos, H. P. & Lima, D. U. 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo e aspectos ecológicos. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 12: 137-162.

Callaway, R.M., Pennings, S.C. & Richards, C.L. 2003. Phenotypic plasticity and interactions among plants. Ecology, 84 (5): 1115–1128.

Cavender-Bares, J. & Bazzaz, F.A. 2000. Changes in drought response strategies with ontogeny in *Quercus rubra*: implications for scaling from seedlings to mature trees. Oecologia, 124: 8-18.

Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J. Rodrigues, M.I., Ricardo, C.P.P., Osorio, M.L., Carvalho, I., Faria, T. & Pinheiro, C. 2002. How plants cope with water stress. Photosynthesis and growth. Annals of Botany, 89: 907-916.

Davies, W.J. & Zhang, J. 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 42: 55-76.

Deans, J. D. 1979. Fluctuations of the soil environment and fine root growth in a young Sitka spruce plantation. Plant and Soil, 52 (2): 195-208.

Díaz, P., Betti, M., Sánchez, D.H., Udvardi, M.K., Monza, J. & Marquez, A.J. 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. New Phytologist, 188 (4): 1001-1013.

Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rerbers, P.A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analitical Chemistry, 28: 350-355.

Edwards, M.E., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V. & Reid, J.S.G. 1985. Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. Planta, 163: 133-140.

Edwards, M.E., Dea, I.C.M., Bulpin, P.V. & Reid, J.S.G. 1986. Purification and properties of a novel xyloglucan-specific-endo-(1,4)-B-glucanase from germinated nasturtium seeds (*Tropaelum majus* L.). Journal of Biological Chemistry, 261: 9489-9494.

Engelbrecht, B.M.J. & Kursar, T.A. 2003. Comparative drought reistance of seedlings of 28 species of co-ocurring tropical woody plants. Oecologia, 136: 383-393.

Espeleta, J. & Eissenstat, D. 1998. Responses of citrus fine roots to localized soil drying: a comparison of seedlings with adult fruiting trees. Tree Physiology, 18: 113-119.

Fan, L. & Neumann, P.M. 2004. The spatially variable inhibition by water deficit of maize root growth correlates with altered profiles of proton flux and cell wall pH. Plant Physiology, 135: 2291-2300.

Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E.,Yamamoto, R. & Neumann, P.M. 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize is related to increase lignin metabolism and progressive stellar accumulation of wall phenolics. Plant Physiology, 140: 603-612.

Fanutti, C., Gidley, M.J., Reid, J.S.G. 1993. Action of a pure xyloglucan endo-transglycolase (formerly called xyloglucan-specific-endo-(1,4)-B-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. Plant Journal, 3: 691-700.

Fotelli, M.N., Radoglou, K.M., Constantinidou, H.I.A. 2000. Water stress responses of seedlings of four mediterranean oak species. Tree Physiology, 20: 1065-1075.

Garcia, P.M.A. 2009. Variações no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) em resposta ao déficit hídrico e sua relação com a tolerância à seca. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 130 p.

Garland, T.Jr. & Kelly, S.A. 2006. Phenotypic plasticity and experimental evolution. The Journal of Experimental Biology, 209: 2344-2361.

Hayashi, T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40:139-168.

Heinricher, E. 1888. Zur biologie der gattung *Impatiens*. Flora (Jena), 71: 163-185. Apud Buckeridge, M. S. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Stirling, Escócia.

Kim, J. Y., Mahé, A., Brangeon, J., Prioul, J. L. (2000a).A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. Plant Physiology, 124: 71-84.

Kolb, P.F. & Robberecht, R. 1996. High temperature and drought stress effects on survival of *Pinus ponderosa* seedlings. Tree Physiology**,** 16: 665-672.

Kooiman, P. 1960. On the occurrence of amyloids in plant seeds. Acta Botanica Neerlandica. 9: 208-219.

Krishna, S. & Ghose, T.P. 1942. Indian forest leaflet. Forest Research Institute Dehra Dun., 23. Apud. Kooiman, P. 1961.

Krishna, S. & Ghose, T.P. 1943. Indian forest leaflet. Forest Research Institute Dehra Dun., 47. Apud. Kooiman, P. 1961.

Langenheim, J.H. 1973. Leguminous resin-producing trees in Africa and South America. In: Megars, Avensu & Duckworth. Tropical forest ecosystems in Africa and South America: a comparative review. Smithsonian Press.

Lebourgeois, F., Lévy, G., Aussenac, G., Clerc, B., Willm, F. 1998. Influence of soil drying on leaf water potential, photosynthesis, stomatal conductance and growth in two black pine varieties. Annual Forest Science, 55: 287-299.

Lee, Y. & Langenheim, J. H. 1975. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). Berkeley: University of California publications in Botany, 69.

Loewenstein, N.J. & Pallardy, S.G. 1998. Drought tolerance, xylem sap abscisic and stomatal conductance during soil drying: a comparison of canopy trees of three temperate deciduous angiosperms. Tree Physiology, 18: 431-439.

Lüttge, U., Haridasan, M., Fernandes, G.W., Mattos, E.A., Trimborn, P., Franco, A.C., Caldas, L.S., Ziegler, H. 1998. Photosynthesis of mistletoes in relation to their hosts at various sites in tropical Brazil. Trees, 12: 167-174.

Luu, D.T. & Maurel, C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. Plant, Cell and Environment, 28: 85-96.

Molle, F. R. D., Brandão, A. D., Tiné, M. A. S. 2009. Variação ao longo do dia da atividade de enzimas do catabolismo de sacarose em plântulas de *Hymenaea courbaril* L. durante a mobilização do xiloglucano de reserva. Revista Brasileira de Botânica, 32: 143-153.

Morillon, R. & Lassalles, J.P. 2002. Water deficits during root development: effects on the growth of roots and the osmotic water permeability of isolated root protoplasts. Planta, 214: 392-399.

Nayyar, N. & Walia, D.P. 2003. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. Biologia Plantarum, 46 (2): 275-279.

Padilla, F.M. & Pugnaire, F.I. 2007. Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. Functional Ecology, 21: 489–495.

Pelleschi, S., Rocher, J.P. & Prioul, J.L. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis on mature maize leafs. Plant, Cell and Environment, 20: 493-503.

Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. & Loureiro; M.E. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant Science. 167 (6): 1307-1314.

Piro, G., Leucci, M.R., Waldron, K. & Dalessandro, G. 2003. Exposure to water stress causes changes in the biosynthesis of cell wall polysaccharides in roots of wheat cultivars varying in drought tolerance. Plant Science, 165: 559-569.

Queiroz, C.G.S., Garcia, Q.S. & Lemos Filho, J.P. 2002. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação**.** Brazilian Journal of Plant Physiology, 14 (1): 59-63.

Ramanjulu, S. & Bartels, D. 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. Plant, cell and environment, 25:141-151.

Reis, D., Vian, B., Darzens, D. & Roland, J. C. 1987. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. Planta**,** 170: 60-73.

Reiss, R. 1889. Uber die Natur der reservecellulose un uber ihre auflosungweise bei der keimung der samen. Landwirtsch Jahrb., 18: 711-765. Apud. Buckeridge, M. S. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Stirling, Escócia.

Santos, H. P., Purgatto, E., Mercier, H., & Buckeridge, M. S. 2004. The control of storage xyloglucan mobilization in cotyledons of *Hymenaea courbaril*. Plant Physiology, 135: 287-299.

Santos, H. P. & Buckeridge, M. S. 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. Annals of Botany, 94: 819-830.

Sayer, M.A.S. & Haywood, J.D. 2006. Fine root production and carbohydrate concentrations of mature longleaf pine (*Pinus palustris* P. Mill.) as affected by season of prescribed fire and drought. Trees - Structure and Function, 20: 165-175.

Schenk, H.J. & Jackson, R.B. 2002. Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/ above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. Journal of Ecology, 90: 480–494.

Sharp, R.E. & LeNoble, M.E. 2002. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. Journal of Experimental Botany, 53: 33-37.

Sharp, R.E., Poroyko V., Hejlek, L.G., Spolle, W.G., Springer, G.K., Bohnert, H.J. & Nguyen H.T. 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. Journal of Experimental Botany, 55: 2343-2351.

Sultan, S.E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. Trends in Plant Sciences, 5: 537–542.

Sultan, S.E. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. Evolution & Development, 5 (1): 25–33.

Székely, G., Ábrahám, E., Csépló, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schemelzer, E., Koncz, C. & Szabados, L. 2008. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. The Plant Journal, 53: 11-28.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2009. Fotossíntese: Reações de Carboxilação in: Fisiologia Vegetal. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 182-219.

Thomas, F.M. & Gausling, T. 2000. Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) to moderate drought. Annual Forest Science, 57: 325-333.

Tiné, M. A. S. 1997. Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 85p.

Tiné, M. A. S. 2002. O conteúdo informacional da molécula de xiloglucano de cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. reflete suas funções em nível celular. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 112p.

Tiné, M. A. S., Cortelazzo, A. L. & Buckeridge, M. S. 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). Plant Science, 154: 117-126.

Trouverie, J., Theavenot, C., Rocher, J.P., Sotta, B. & Prioul, J.L. 2003. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. Journal of Experimental Botany. 54: 2177-2186.

West-Eberhard, M. J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. Annual Review of Ecology Systems, 20: 249-278.

Winter, H., Huber, S.C. 2000**.** Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. Critical Reviews in Plant Sciences, 19: 31-67.

Yamada, N., Morishita, H., Urano, K., Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.& Yoshiba, Y. 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. Journal of Experimental Botany, 56: 1975-1981.

Yordanov, I., Velikova, V., T. Tsonev. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgarian Journal of Plant Physiology, special issue: 187–206.

Zhang, J. & Davies, W.J. 1989. Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. Plant, Cell & Environment, 12: 73-81.