

**EFEITOS DO ANELAMENTO DO CAULE
SOBRE AS RELAÇÕES FONTE-DRENO EM
PLANTAS DE *Inga vera* WILLD.**

MELINE DE OLIVEIRA SANTOS

2009

MELINE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITOS DO ANELAMENTO DO CAULE SOBRE AS RELAÇÕES
FONTE-DRENO EM PLANTAS DE *Inga vera* WILLD.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Meline de Oliveira.

Efeitos do anelamento do caule sobre as relações fonte-dreno em plantas de *Inga vera* Willd / Meline de Oliveira Santos. – Lavras : UFLA, 2009.

49 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Inga vera*. 2. Anelamento. 3. Translocação. 4. Fotoassimilados. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.322041

MELINE DE OLIVEIRA SANTOS

**EFEITOS DO ANELAMENTO DO CAULE SOBRE AS RELAÇÕES
FONTE-DRENO EM PLANTAS DE *Inga vera* WILLD.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 16 de junho de 2009.

Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart

Unilavras

Prof. Dr. Marco Antônio Menezes Neto

UFPA

Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida.

A minha família, por tudo que eu sou e por ser meu porto seguro.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade da realização da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Donizeti Alves, por todo incentivo, orientação, apoio e amizade nesses dois anos de convívio profissional.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, Patrícia de Fátima Pereira Goulart e Marco Antônio Menezes Neto.

Aos funcionários Evaristo, Tanhan, Lena, Joel, Odorêncio e Barrinha, pela simpatia, amizade e ajuda sempre prestada.

Aos amigos do Laboratório: Paôla, Camila, Sidnei, Neidiquele, André, Solange, Kamila, Brenda e Nádia pela amizade e ajuda na realização do meu trabalho.

Aos colegas do curso, pela agradável convivência.

A Solange e Emanuella, por toda cumplicidade, pelas tardes de estudos e fofocas e pelas boas gargalhadas, fossem elas de felicidade ou de desespero.

A Nádia, Lisa, Larissa, Thamiris, Isabella e Gabriela, minha “família” aqui em Lavras, por todos os momentos que passamos juntas, pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade. Meninas vocês estarão para sempre em meu coração.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Material vegetal.....	8
3.2 Condições ambientais do experimento.....	9
3.3 Crescimento vegetativo.....	11
3.4 Atividade enzimática.....	11
3.4.1. Avaliação da atividade das invertases (ácida e neutra) e sacarose sintase (Susy).....	11
3.4.2 Avaliação da atividade da redutase do nitrato.....	12
3.5 Análises bioquímicas.....	13
3.6 Quantificação de clorofilas.....	14
4.1 Crescimento.....	14
4.2 Teor de clorofila total.....	22
4.3 Atividade das enzimas sacarolíticas.....	24
4.4 Carboidratos.....	34
4.5 Atividade da redutase do nitrato.....	39
5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Locais de anelamento: a) anelamento no meio do caule; b) anelamento na base do caule.....	9
FIGURA 2	Representação dos estádios de desenvolvimento das brotações nas duas épocas de avaliações.....	10
FIGURA 3	Número de brotações (A), número de folhas das brotações (B) e massa seca das brotações (C).....	15
FIGURA 4	Altura (A) e número de folhas (B) de plantas sem anelamento do caule (SA)	17
FIGURA 5	Massa seca de folhas superiores (A), folhas inferiores (B) e caule (C) de plantas.....	20
FIGURA 6	Massa seca de parte aérea (A), raiz (B) e massa seca total (C) de plantas.....	21
FIGURA 7	Teor de clorofila em folhas da metade superior (A) e inferior (B) de plantas.....	23
FIGURA 8	Atividade da invertase ácida em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA)	27
FIGURA 9	Atividade da invertase ácida em folhas superiores (A), inferiores (B) e raízes (C) de plantas.....	28
FIGURA 10	Atividade da invertase neutra em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA)	29
FIGURA 11	Atividade da invertase neutra em folhas superiores (A), inferiores (B) e raízes (C) de plantas	30
FIGURA 12	Atividade da sintase da sacarose (SuSy) em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA).....	32
FIGURA 13	Atividade da sacarose sintase (SuSy) em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C).....	33

FIGURA 14	Teores de açúcares solúveis totais em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C).....	36
FIGURA 15	Teores de açúcares redutores em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas	37
FIGURA 16	Teores de amido em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA).....	38
FIGURA 17	Atividade da redutase do nitrato em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA),.....	42
FIGURA 18	Atividade da redutase do nitrato em plantas sem anelamento do caule (SA)	43

RESUMO

SANTOS, Meline de Oliveira. **Efeitos do anelamento do caule sobre as relações fonte-dreno em plantas de *Inga vera* Willd.** 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a influência do anelamento do caule em mudas de ingá na distribuição de fotoassimilados e no metabolismo do carbono e nitrogênio. As plantas, com cerca de um ano de idade, foram submetidas a três diferentes condições: sem anelamento do caule (SA), anelamento na parte mediana do caule (AM) e anelamento na base do caule (AB). As avaliações foram realizadas imediatamente após o anelamento (E0), e em outras duas épocas, referentes aos estádios de desenvolvimento das brotações que surgiram abaixo da região anelada: -E1- início das brotações; -E2- brotações com primeiras folhas em expansão. A cada coleta foram avaliados número de folhas e altura das plantas, número de brotações e número de folhas das brotações, massas secas de folhas das porções superior e inferior, caule, raízes e brotações, teor de clorofila, análises bioquímicas de teor de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e atividade das enzimas invertase ácida e neutra, sacarose sintase (SuSy) e redutase do nitrato. Os resultados mostraram que o anelamento do caule do ingazeiro, por um período de um mês, não afetou o desenvolvimento total das plantas, sendo a massa seca de folhas superiores determinante para o aumento na massa seca total ao final do experimento. O anelamento acelerou a síntese de clorofila em folhas da metade superior, e acentuou a senescência de folhas inferiores, quando o anelamento foi realizado na base do caule. Por se tratarem de plantas ainda em desenvolvimento, foi encontrada maior atividade da invertase ácida em relação à invertase neutra, principalmente em folhas inferiores. Em relação à redutase do nitrato, o anelamento afetou a atividade da enzima já na segunda avaliação, onde as testemunhas apresentaram maior atividade em folhas superiores, enquanto que nas plantas aneladas essa maior atividade foi encontrada nas folhas da metade inferior. Dessa forma, entre as plantas aneladas, as que sofreram o anelamento na parte mediana do caule se comportaram de maneira semelhante a testemunha, enquanto que as aneladas na base foram as que mais se diferenciaram.

Palavras-chave: *Inga vera*, anelamento, translocação, fotoassimilados, crescimento.

* Orientador: José Donizeti Alves - UFLA

ABSTRACT

SANTOS, Meline de Oliveira. **Effects of stem girdling on source-sink relations in *Inga vera* Wild plants.** 2009. 49 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This research aimed to evaluate the influence of stem girdling in *Inga* seedlings on photoassimilate distribution and carbon and nitrogen metabolism. The plants, around 1 year old, were submitted to three different conditions: without stem girdling (SA), girdling in the median stem region (AM) and the girdling in the stem basis (AB). The evaluations were made immediately after girdling (E0), and other two times, related to shoot development stages that appeared below the girdled region: -E1- onset of shooting, -E2- shooting with first leaves in expansion. For each time there were evaluated the number of leaves, plant height, shoot number and number of shoot leaves, leaves dry mass from upper and down regions, stem, root and shoot, chlorophylls level, starch, reducing sugars and the enzyme activities of acid and neutral invertase, sucrose synthase (SuSy) and nitrate reductase. The results showed that girdling of *Inga* stem by a month, did not affect the total plant development, being the dry mass of upper leaves important to the increase of total dry mass in the end of experiment. The girdling accelerate the chlorophyll synthesis in the leaves located in the upper half portion and increased the senescence in lower leaves when girdling was made in stem basis. The considering the plants was still in development, it was found a higher acid invertase activity in relation to neutral invertase, mainly in lower leaves. In relation to nitrate reductase, the girdling affected the enzyme activity, although in the second evaluation, where the controls showed higher activity in upper leaves, while in girdled plants this higher activity was found in the lower half portion. Among the girdled plants, that ones with girdling treatment in the median stem region had a similar behavior of control, while the girdling made in the basis showed the highest differences.

Keywords: *Inga vera*, girdling, translocation, photoassimilate, growth.

* Adviser: José Donizeti Alves - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O ingazeiro (*Inga vera* Willd), uma planta comumente encontrada em matas ciliares e regiões de várzea, é recomendada para reflorestamento de áreas como margens de represas, encostas de rio, lagos e açudes. É uma árvore de pequeno porte com crescimento rápido, podendo atingir dois metros de altura nos dois primeiros anos de idade, demandando grandes quantidades de fotoassimilados para as diferentes partes da planta, como fonte de energia e esqueletos de carbono para a síntese de compostos para seu crescimento.

A distribuição dos fotoassimilados na planta se dá pelo sistema fonte-dreno, sendo as fontes as regiões de produção e os drenos as de utilização. A taxa e o sentido de translocação dos fotoassimilados variam de acordo com a capacidade de produção da fonte, a força do dreno e influência de fatores do ambiente.

Condições estressantes podem inverter o sentido da translocação, fazendo com que órgãos que antes eram drenos, como raízes, passem a ser fontes, disponibilizando suas reservas para o abastecimento de outros compartimentos da planta. Fatores que afetam a integridade do floema, como o anelamento do caule, por exemplo, podem influenciar o transporte de fotoassimilados para a região abaixo deste, modificando todo o seu metabolismo.

O anelamento do caule é uma prática que consiste da retirada de uma faixa do floema, causando um acúmulo de carboidratos e fitohormônios acima da região do anelamento, diminuindo o crescimento vegetativo, alterando as relações fonte-dreno.

A distribuição dos fotoassimilados também é influenciada pela atividade de enzimas sacarolíticas, como as invertases e a sacarose sintase. A sacarose,

que é o carboidrato preferencialmente translocado, precisa ser clivada em hexoses para que possa ser utilizado na produção de energia ou síntese de outros compostos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do anelamento do caule em mudas de ingá na distribuição de fotoassimilados e no metabolismo do carbono e nitrogênio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O ingazeiro (*Inga vera* Willd) é uma planta pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae. Como outras Mimosoideae, possuem a capacidade de associar-se a microorganismos fixadores de nitrogênio, formando nódulos radiculares e contribuindo para o ciclo do nitrogênio, desempenhando grande importância ecofisiológica. Apresenta folhas compostas, com 3 a 6 pares de folíolos lanceolados, que podem atingir até 14 cm de comprimento por 4,5 cm de largura. Possui grande abrangência, ocorrendo na América Central, Colômbia até Argentina e Uruguai. Na América Central é utilizada como a principal árvore de sombra para plantações de café (Rodríguez, 1990). No Brasil, pode ser encontrada em quase todos os estados, comumente em ecossistemas florestais e, especialmente, em regiões de matas ciliares. Por esta razão, a sua utilização é recomendada para o reflorestamento e revegetação de margens de cursos d'água e represas, uma vez que sobrevive a longos períodos sob condições de submersão parcial e total (Cunha, 2003).

O desenvolvimento da planta no campo é rápido, atingindo facilmente 2 m de altura aos dois anos de plantio (Lorenzi et al., 2006). Esta característica de rápido crescimento demanda um conjunto ordenado de processos metabólicos e de transporte que governam a síntese e transformação de (foto)assimilados e o seu fluxo para os diversos compartimentos da planta (Duarte et al., 2008).

Nas folhas (local considerado como fonte), ocorre a síntese de carboidratos, os quais são translocados para os tecidos (drenos) na forma de sacarose, para suprir o metabolismo e desenvolvimento vegetal e/ou para o acúmulo na forma de sacarose ou amido (Leite et al., 2009). Esses processos são acompanhados, durante a vida do vegetal, por constantes mudanças nas relações fonte-dreno (Roitsch & González, 2004).

Na parte metabólica, os fotoassimilados após sua síntese primária passam por uma série de transformações que vão desde a polimerização de açúcares simples até o seu particionamento da sacarose pela ação das invertases e sacarose sintase (Susy). Em plantas superiores essas enzimas catalisam a hidrólise da sacarose em hexoses disponibilizando para as células carbono e energia para a manutenção da respiração e daí para a síntese de inúmeros compostos orgânicos, vitais para todas as fases do ciclo de vida vegetal (Koch, 2004; Trouverie et al., 2004; Oliveira et al., 2006). As invertases desempenham um importante papel no particionamento da sacarose e no transporte a longa distância por criar o gradiente de concentração de sacarose entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, revelando função fundamental na partição dos fotossintetizados entre armazenamento e crescimento, pelo controle da relativa força do dreno (Koch 2004; Roitsch & González, 2004).

As invertases podem ser classificadas de acordo com a sua localização subcelular, pH ótimo de atividade e seus respectivos pontos isoelétricos. Invertases ácidas localizadas no interior do vacúolo e da parede celular estão associadas com o transporte de açúcares para a zona de crescimento ativo, sendo mais ativas no apoplasto de diversas estruturas drenos (Weschke et al., 2003). Já as invertases neutras ou alcalinas ocorrem no citosol de células vegetais (Yao et al., 2009) e estão envolvidas na mobilização da sacarose do vacúolo para atender à demanda metabólica da célula (Vattuone et al., 1981; Sturm & Chrispeels, 1990).

As funções específicas das diversas formas de invertases não são claras, mas parecem regular a entrada de sacarose nas suas diferentes vias de utilização (Sturm, 1999). A invertase ácida vacuolar contribui em destaque para a importação de sacarose, especialmente durante a expansão do crescimento em diversas estruturas drenos, como pontas de raízes, gemas e folhas em desenvolvimento (Sturm & Tang, 1999; Andersen et al., 2002; Weschke et al.,

2003). Ela contribui consideravelmente para o fluxo de sacarose através do tonoplasto, e para a entrada de hexoses no metabolismo citoplasmático (Koch, 2004). Esse papel para a invertase vacuolar é adicional às já reconhecidas funções de regulação do turgor e a regulação do balanço de açúcar em tecidos de frutos e tubérculos maduros (Sturm & Tang, 1999).

Em contraste, pouco se sabe sobre a função fisiológica da invertase neutra do citosol, por ela ser extremamente lábil, sua atividade enzimática é rapidamente perdida durante a preparação da amostra (Yao et al., 2009). A invertase neutra do citosol é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação da sacarose visando manter as concentrações de hexoses no citosol (Albertson et al., 2001).

A outra rota sacarolítica é catalisada pela Susy e envolve uma clivagem reversível de sacarose dependente de UDP, produzindo UDP-glicose e frutose. A Susy está, geralmente, associada ao crescimento e à expansão celular, portanto, está presente em quase todos os tecidos das plantas. Tem seu papel reconhecido em vários processos metabólicos, admitindo-se que a sua atividade esteja relacionada, predominantemente, com a síntese de parede celular e de amido (Winter & Huber, 2000). No citoplasma, a Susy pode estar associada à membrana celular, exatamente para fornecer intermediários para a síntese de celulose (Ruan et al., 2003; Koch, 2004).

Outro aspecto fundamental para o rápido crescimento e desenvolvimento das plantas é o eficiente suprimento de nitrogênio orgânico para os diversos sítios de crescimento. O nitrato é a principal forma de nitrogênio inorgânico disponível para as plantas e a redutase de nitrato é a primeira enzima da rota de assimilação do N-inorgânico, assumindo, portanto, papel de extrema importância no crescimento e desenvolvimento da planta (Li et al., 2009).

Diversos aspectos do metabolismo do nitrogênio, notadamente o passo catalisado pela redutase do nitrato tem sido estudado. Para o ingazeiro, em um

dos poucos estudos relacionando crescimento com a assimilação do nitrogênio, observou-se grande acúmulo de nitrato nas folhas, mas uma maior atividade da redutase do nitrato nas raízes (Torres, 2003). Já em um outro estudo realizado por Cunha (2003) foi observado uma maior atividade da redutase do nitrato em folhas. Entender a relação entre a atividade desta enzima na raiz e parte aérea, e relacioná-la com o transporte de carboidratos entre fonte e dreno, pode ajudar na visualização de aspectos fisiológicos de interesse, com aplicabilidade nos sistemas florestais.

Em diversas espécies tem sido demonstrado que a atividade metabólica das raízes é altamente dependente da importação de açúcares e que fatores que afetam a integridade das folhas e/ou o transporte no floema, induzem rápido declínio no metabolismo das raízes, em virtude do decréscimo na disponibilidade de fotoassimilados (Koster, 1963; Radin et al, 1978), particularmente na assimilação do nitrato que requer energia metabólica e esqueletos carbônicos para formação dos aminoácidos, que são supridos em órgãos não fotossintetizantes pelos açúcares fornecidos pelas folhas (Oaks & Hirel, 1985; Bredemeier & Mundstock, 2000).

Em relação ao transporte de assimilados, de maneira geral, plantas com altas taxas de crescimento contam com um eficiente elo de conexão entre os sistemas radicular e aéreo, mediante uma rede de condução, o xilema e o floema, que se encontram organizados de forma a permitir a circulação de água, solutos minerais e orgânicos na planta entre fonte e dreno.

O xilema, posicionado mais internamente no caule, apresenta-se com a principal função do transporte unidirecional ascendente de água e solutos minerais, sempre da raiz para a parte aérea da planta, seguindo a corrente transpiratória (Sartori et al., 2005). Tanto a água como os solutos que chegam até as folhas, juntamente com os carboidratos sintetizados pela fotossíntese, são

agora retranslocados de uma região para outra na planta, via floema (Alves, 2008).

Anatomicamente, o floema se localiza externamente ao xilema, estando então mais próximo da porção exterior do caule (Alves, 2008). O transporte via floema, pode ocorrer bidirecionalmente, tanto no sentido ascendente quanto descendente. Vê-se, portanto, que a direção do transporte no floema não é definida com respeito à força gravitacional, mas sim pela localização relativa das áreas de produção (fonte) e utilização (dreno) dos produtos da fotossíntese.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para manipular experimentalmente as relações fonte e dreno nas plantas. Dentre elas destaca-se o anelamento do caule que consiste na remoção de um anel completo da casca (epiderme, camadas subepidérmicas e floema) do tronco ou de ramos da árvore, seguida do envolvimento do local com filme de PVC a fim de se minimizar danos de desidratação do tecido e ataques de pragas e microrganismos. Como consequência do rompimento do floema, há a interrupção do fluxo de seiva elaborada das folhas para as raízes, provocando, dois a três meses após o fenômeno, um espessamento acima da região anelada, devido ao acúmulo de fotoassimilados (principalmente sacarose) e outros solutos orgânicos. Em casos mais severos, morrem as radículas interrompendo a absorção de água observando-se a seguir, a murcha de folhas e sintomas de deficiência de macro e micronutrientes que evoluem para a seca e morte da planta (Alves, 2008). Por outro lado, em algumas espécies, ocorre secreção de uma goma na região anelada e o tecido de cicatrização rapidamente forma-se em cada lado do corte. Estudos anatômicos têm mostrado que conexões entre as células do floema podem ser restabelecidas, possibilitando o fluxo de assimilados entre os diferentes compartimentos da planta. (Hamada et al., 2008).

No setor florestal, esta prática, embora pouco difundida, já foi testada por alguns pesquisadores, como Santin et al. (2008) e Medrado et al. (2002) em

Ilex paraguariensis, e Ribeiro et al. (1992) em *Eucalyptus grandis*, visando à indução de brotações, numa tentativa de recuperar árvores depauperadas. O estímulo à brotação induzido pelo anelamento pode ser explicado pelo fato de tal prática provocar o aumento da concentração de auxina e carboidratos acima da região anelada, e citocininas abaixo (Dann et al., 1985; Sartori & Ilha, 2005). Dessa forma, uma menor concentração de auxina na região inferior ao anelamento pode ocasionar um decréscimo do balanço auxina/citocinina, induzindo a ocorrência de brotações (Santin et al., 2008).

Os efeitos do anelamento não podem ser explicados somente em função da distribuição dos carboidratos, pois já foram detectadas alterações no balanço endógeno de auxinas (Dann et al., 1985), giberelinas e citocininas (Cutting & Lyne, 1993) e elementos minerais. O anelamento inicialmente provoca acúmulo de substâncias reguladoras de crescimento, produzidas acima da região anelada (Sartori & Ilha, 2005), além de causar uma diminuição na atividade da redutase do nitrato nas raízes, sugerindo que o processo de redução é limitado pela disponibilidade de fotoassimilados (Queiroz et al., 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Neste trabalho foi utilizada a espécie *Ingá vera* Willd. por fazer parte de um estudo de revegetação ciliar do Alto Rio Grande e margens dos reservatórios das usinas de Itutinga e Camargos, MG. As mudas, com cerca de seis meses de idade, cedidas pela Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), foram transferidas para sacos plásticos com capacidade para 1L, contendo uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção de 1:1:1 e mantidas em casa de vegetação com sombrite, cujas malhas interceptavam 30% da radiação solar. Na época do transplante foi realizada uma adubação com 2,25g de NH_4NO_3 e 1,25g de KCl por planta.

3.2 Condições ambientais do experimento

As plantas foram previamente selecionadas com base na uniformidade e altura, descartando-se aquelas que apresentavam brotações em seus ramos. Com cerca de um ano de idade, as plantas foram submetidas a três diferentes condições: sem anelamento do caule (SA), anelamento na parte mediana do caule (AM) e anelamento na base do caule (AB). De maneira geral, o anelamento consistiu da retirada do floema via remoção de 1 cm do comprimento da casca. O local do anelamento foi envolvido com filme de PVC a fim de se minimizar danos de desidratação do tecido e ataques de pragas e microrganismos. O anelamento na parte mediana do caule foi realizado tomando-se como base a altura onde se encontrava a metade do número de folhas da planta naquele estágio de desenvolvimento, enquanto que o anelamento na base do caule foi realizado a cerca de dez centímetros do coleto (Figura 1).

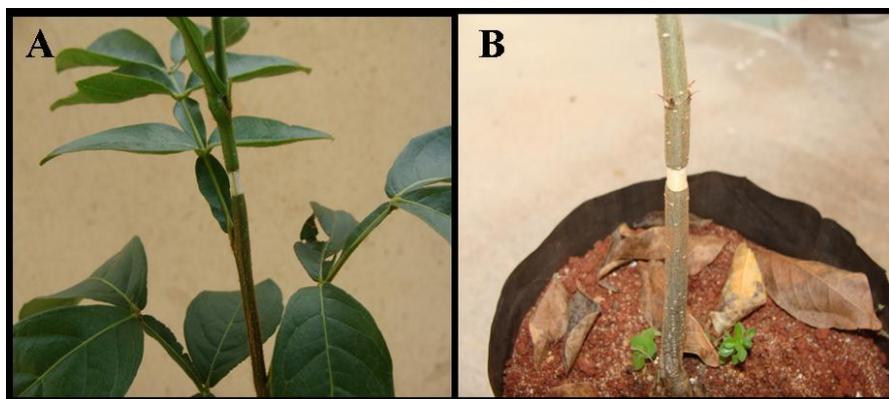


FIGURA 1 Locais de anelamento: a) anelamento na parte mediana do caule; b) anelamento na base do caule.

As avaliações foram realizadas imediatamente após o anelamento (E0), e em outras duas épocas, referentes aos estádios de desenvolvimento das brotações que surgiram abaixo da região anelada sendo a segunda (E1), no início das

primeiras brotações (Figura 2A e 2C), o que ocorreu há aproximadamente 15 dias após o anelamento. A terceira avaliação (E3) foi aos 30 dias após o anelamento quando as primeiras folhas das brotações estavam em início de expansão (Figura 2 B e 2D).

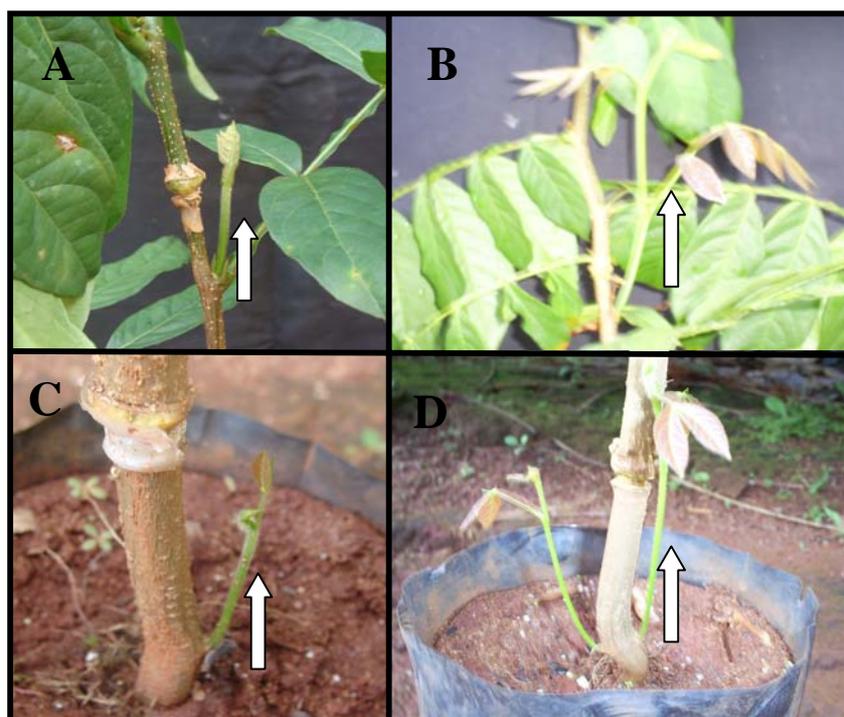


FIGURA 2 Representação dos estádios de desenvolvimento das brotações nas duas épocas de avaliações. A) planta anelada no meio do caule com brotações em estágio inicial de desenvolvimento (E1); B) planta anelada no meio do caule com brotações apresentando as primeiras folhas em início de expansão (E2); C) planta anelada na base do caule com brotações em estágio inicial de desenvolvimento (E1); D) planta anelada na base do caule com brotações apresentando primeiras folhas em início de expansão (E2). As setas indicam as brotações.

A cada coleta foram realizadas análises de crescimento, enzimáticas, e bioquímicas. Foram realizadas avaliações nas folhas das porções superiores (Fs) e inferiores (Fi) das plantas (tomando-se como base a altura onde se encontrava a metade do número de folhas da planta naquele estágio de desenvolvimento), assim como em raízes (R).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com três repetições de uma planta, para cada época de coleta. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANAVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o programa estatístico SISVAR. (Ferreira, 1999).

3.3 Crescimento vegetativo

Para as avaliações do crescimento vegetativo foram quantificadas as massas secas de folhas das porções superior e inferior, caule, raízes e brotações, sendo que essa característica foi quantificada após quatro dias em estufa a 70°C. Adicionalmente, foi avaliado o número de folhas e a altura das plantas, número de brotações e número de folhas das brotações. As alturas das plantas foram avaliadas medindo-se a distância entre o coleto e o ápice.

3.4 Atividade enzimática

3.4.1. Avaliação da atividade das invertases (ácida e neutra) e sacarose sintase (Susy)

A atividade das enzimas invertases e da SuSy foram avaliadas pelo método “in vivo”, conforme Cairo (2007).

Para as análises enzimáticas, foram coletadas amostras de raízes absorventes e folhas que foram imediatamente armazenadas a -80°C, para posterior análise.

O material vegetal oriundo de tecidos de folha e raiz, foi cortado em pequenos fragmentos, com tamanho médio aproximado de 2 mm. Amostras de 200 e 300 mg foram adicionadas a meios de reação para invertase (ácida e neutra) e sacarose sintase (SuSy), respectivamente, constituídos de reagentes específicos para a realização do ensaio de cada enzima.

O meio de reação para a invertase ácida foi constituído de 200 µL de tampão acetato de sódio pH 4,7 1,0 M, 100 µL de MgCl₂ 0,1 M e 400 µL de sacarose 1,0 M, sendo o restante do volume completado com água até totalizar 2.000 µL. O meio de reação para a invertase neutra foi semelhante ao da invertase ácida, exceto em relação ao tampão e ao pH, que foram substituídos por fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,5. Ambos os ensaios foram mantidos em banho-maria, a 37°C, durante 60 minutos.

O meio de reação para a SuSy foi constituído de 300 µL de tampão HEPES-KOH pH 6,0 1,0 M, 150 µL de MgCl₂ 0,1 M, 150 µL de UDP 0,1 M e 600 µL de sacarose 1,0 M, sendo o restante do volume completado com água até totalizar 3.000 µL. O ensaio foi mantido em banho-maria, a 25°C, durante 60 minutos.

Para a determinação das concentrações de açúcares redutores produzidos a partir das reações enzimáticas, utilizou-se o método descrito por Miller (1959). A atividade das enzimas foi expressa em micromol de açúcar redutor produzido por grama de matéria fresca (MF) por hora ($\mu\text{mol AR g}^{-1} \text{MF h}^{-1}$).

3.4.2 Avaliação da atividade da redutase do nitrato

A atividade da redutase do nitrato “in vivo” foi determinada nas folhas e raízes, conforme Jaworski (1971). A coleta do material foi realizada entre 9 e 10 horas da manhã. O material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos, com tamanho médio aproximado de 2 mm. Amostras de 500 mg foram adicionadas a 5 mL de meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH

7,5, n-propanol 1% (v/v) e KNO₃ a 0,1 M, em um béquer protegido da luz. Posteriormente, sofreram infiltração à vácuo (2 minutos) por duas vezes e foram incubados em banho-maria a 30°C por 30 minutos. Depois do tempo de incubação, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL de cada repetição e transferida para o meio de reação composto de 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N; 1 mL de N-2-naftil etileno 0,02%. O volume foi completado para 4 mL com água destilada. A concentração de nitrito produzida foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da enzima redutase foi expressa em micromol de nitrito produzido por grama de matéria fresca (MF) por hora ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$).

3.5 Análises bioquímicas

Imediatamente após a coleta, amostras de folhas e de raízes absorventes foram colocadas em estufa a 70°C por quatro dias. Em seguida, 300 mg de matéria seca foram maceradas em 5 mL do extrator tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7, submetendo-se ao banho-maria a 40°C, por 30 minutos. O extrato foi centrifugado, a 10.000 x g por 20 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido e os sobrenadantes combinados.

A quantificação dos açúcares solúveis totais (AST) foi realizada seguindo o método da Antrona (Dische, 1962). A quantificação dos açúcares redutores (AR) seguiu o protocolo descrito por Miller (1959), através de DNS.

Para a extração do amido, o pellet da centrifugação anterior foi novamente ressuscitado em 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida, foram adicionados 2 mL da solução da enzima amiloglicosidase, contendo 12,6 unidades, e novamente incubado em banho-maria, a 40°C, por duas horas. Após a centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL. Para a quantificação do amido, utilizou-se o método da Antrona (Dische, 1962).

3.6 Quantificação de clorofilas

Os teores de clorofila total foram avaliados em extratos obtidos após a maceração de 0,1 g de matéria fresca de folhas das porções superiores e inferiores, sendo essas as mesmas utilizadas para a avaliação da atividade da redutase do nitrato. As amostras foram maceradas em almofariz com 5 mL de acetona (80%), sendo o extrato filtrado e o volume completado para 10 mL, em sala escura mantida com luz verde. Leituras dos extratos foram realizadas nos comprimentos de onda de 663 e 645 nm para clorofila a e b, respectivamente. O teor de clorofila total foi calculado conforme metodologia de Arnon (1949). Foram realizadas diluições nos extratos quando esses se encontravam muito concentrados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento

As plantas que sofreram a retirada de um anel da casca, independentemente do local de anelamento e da época de amostragem apresentaram o mesmo número de brotações abaixo deste ponto (Figura 3A). O número de folhas nas brotações, assim como a massa seca das brotações somente variou na segunda avaliação onde se observa maiores valores nas plantas cujo anelamento foi feito na parte mediana do caule (Figura 3B).

O estímulo à brotação induzido pelo anelamento pode ser explicado pelo fato de tal prática provocar aumentos das concentrações de auxina acima e de citocininas abaixo da região anelada (Dann et al., 1985; Sartori & Ilha, 2005).

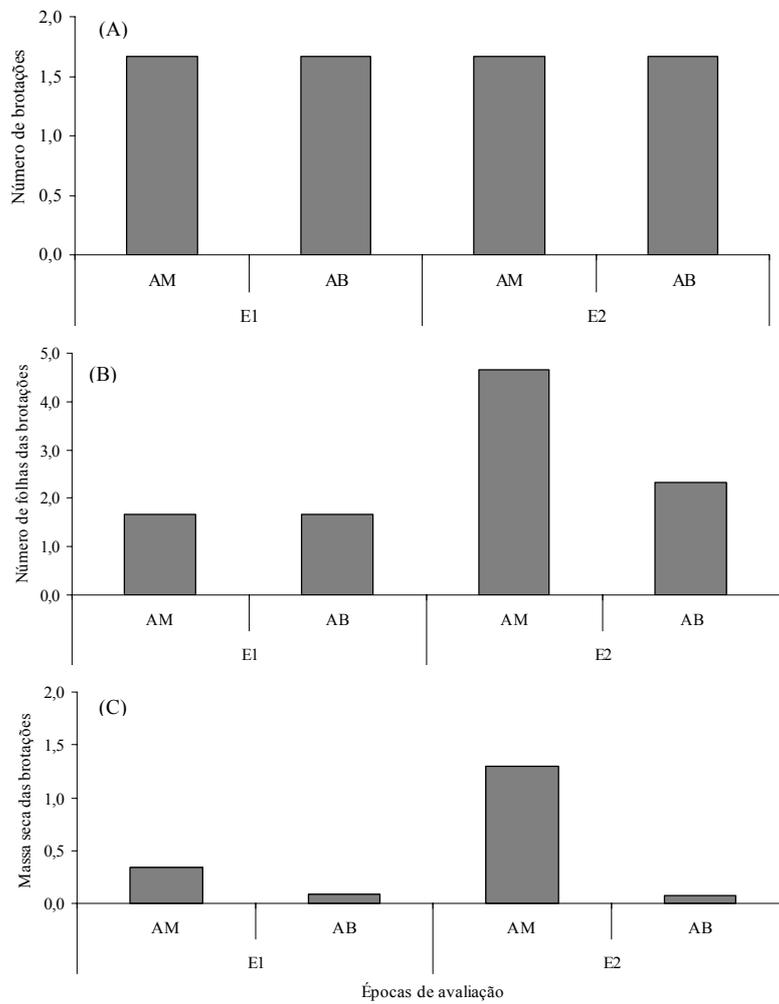


FIGURA 3 Número de brotações (A), número de folhas das brotações (B) e massa seca das brotações (C) de plantas com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em início de expansão.

Esta variação nas concentrações destes dois hormônios gera uma diminuição da relação auxina/citocinina abaixo da região anelada, que segundo Santin et al. (2008), estimula brotações neste local. Ainda segundo estes autores, esse estímulo à indução de novos brotos normalmente está relacionado a uma estratégia que certas espécies utilizam para repor a área foliar perdida mediante o estresse provocado pela ação da remoção do anel de casca.

Em um estudo realizado por Santin et al. (2008), foi observado que o anelamento na base do tronco de *Ilex paraguariensis* induziu brotações abaixo da região anelada em 60% das árvores. Já Ribeiro et al. (1992) relataram que ao testarem o efeito do anelamento e reguladores de crescimento na indução de brotação de cepas de *Eucalyptus grandis*, verificaram que o anelamento da metade do tronco proporcionou um acréscimo de 23 % na sobrevivência das cepas, devido à emergência das novas brotações.

Nas duas épocas de avaliação após o anelamento, esta prática afetou negativamente o crescimento em altura das plantas cuja retirada do anel se deu na região da base do caule (AB), comparativamente à testemunha, sem anelamento (SA) (Figura 4A). Uma vez que, ao contrário da testemunha, sem anelamento (SA) e das plantas com anelamento na parte mediana do caule (AM), as plantas aneladas na base do caule não apresentaram nenhum incremento em altura com o decorrer das épocas de avaliação.

Em relação ao número de folhas, não se verificaram diferenças estatísticas entre os tratamentos nas três primeiras épocas de amostragem (Figura 4B). É importante ressaltar que houve lançamento de novas folhas nessas plantas. Entretanto, observou-se também uma senescência e queda das folhas baixas, o que anula em número o lançamento foliar. O mesmo fenômeno ocorreu em menor intensidade com a testemunha.

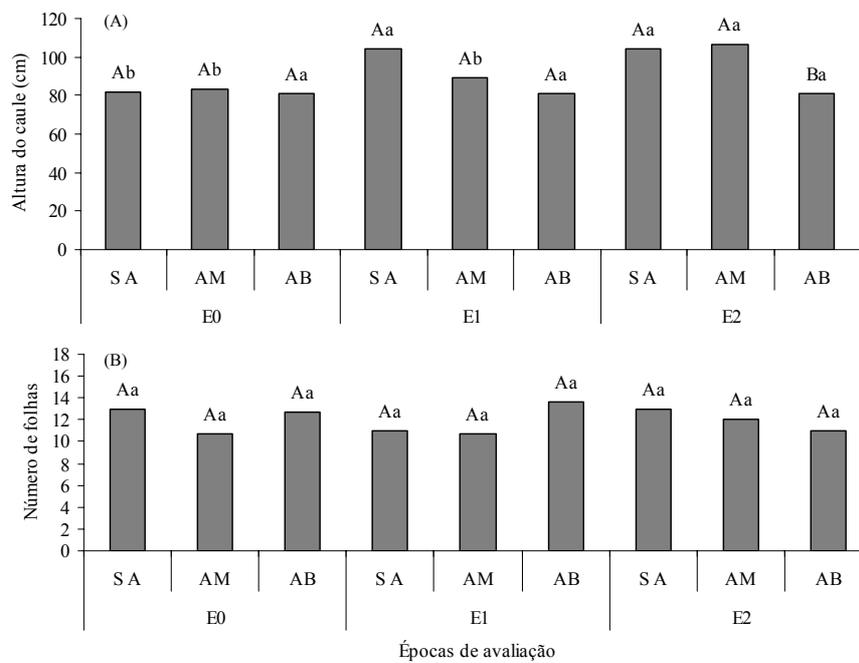


FIGURA 4 Altura (A) e número de folhas (B) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

A massa seca de folhas, tanto da metade superior como da metade inferior, não variou em função do anelamento do caule nas duas primeiras avaliações. Já na última época, as plantas que sofreram a retirada de um anel na parte mediana do caule (AM) apresentaram um crescimento de matéria seca nas folhas superiores, o que não ocorreu com as demais. Tanto as testemunhas (SA) quanto as plantas que sofreram anelamento na base do caule (AB) apresentaram uma diminuição na massa seca de folhas superiores no final do período experimental (Figura 5A). Nesse período também foi observada uma redução na massa seca de folhas inferiores nas plantas com anelamento na base do caule (Figura 5B)

Estes resultados mostram que a maior massa seca das folhas superiores de plantas com anelamento na parte mediana do caule (AM) pode ter sido em decorrência do próprio anelamento. Como essa prática impede a translocação de fotoassimilados, resulta em um acúmulo de carboidratos acima da região anelada, permitindo, em um primeiro momento, um maior investimento no crescimento de órgãos que se localizam acima desse ponto (Sartori & Ilha, 2005). Já para as plantas aneladas na base (AB) e testemunhas (SA) essa redução na massa seca de folhas superiores foi devido à senescência e queda de algumas folhas inferiores, o que fez com que as folhas superiores se encontrassem em estádios iniciais de crescimento. Foi observado que em plantas que sofreram anelamento na base do caule a senescência das folhas foi mais intensa que nas demais.

Tal fato pode ter sido ocasionado por uma senescência e abscisão de alguns folíolos, em decorrência da produção de etileno estimulada pelo anelamento do caule, uma vez que esse hormônio tem sua síntese induzida por injúrias mecânicas (Taiz & Zeiger, 2004), o que resultaria em uma diminuição na massa seca, mesmo aumentando o número de folhas. Outra hipótese seria que

as folhas mais velhas da base, sofreram um processo natural de senescência e abscisão, sendo repostas por folhas jovens no topo do caule. A diminuição na massa seca de folhas superiores, portanto, seria decorrente do menor acúmulo de massa seca por se tratarem de folhas ainda em expansão, em plena fase de crescimento, quando comparadas a folhas mais maduras.

Quanto à massa seca do caule, essa não sofreu influência dos tratamentos (Figura 5C). A análise conjunta dos dados entre crescimento em altura (Figura 4A) e massa seca do caule permite inferir que nas plantas aneladas na parte mediana do caule (AM) e na testemunha essas duas características responderam dentro de um mesmo padrão, enquanto que nas plantas aneladas na base (AB) o crescimento do caule se deu, preferencialmente em diâmetro.

Uma vez que massa seca do caule não variou, em última análise, a massa seca total da parte aérea seguiu as mesmas variações no crescimento das folhas superiores entre os tratamentos, sendo que na última época os maiores valores foram encontrados em plantas com anelamento na parte mediana do caule (Figura 6A). No caso de crescimento subterrâneo, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e entre as datas de coleta (Figura 6B). Portanto a massa seca total da planta seguiu o mesmo padrão de comportamento da parte aérea (Figura 6C).

Na análise geral do crescimento das plantas, observou-se que embora tenha havido diferenças entre a massa seca dos diferentes compartimentos no final, uma compensou a outra, resultando no mesmo padrão de resposta entre plantas aneladas ou não. Isto implica dizer que o anelamento do caule do ingazeiro por um período de um mês, não afetou o desenvolvimento total dessas plantas (Figura 6C).

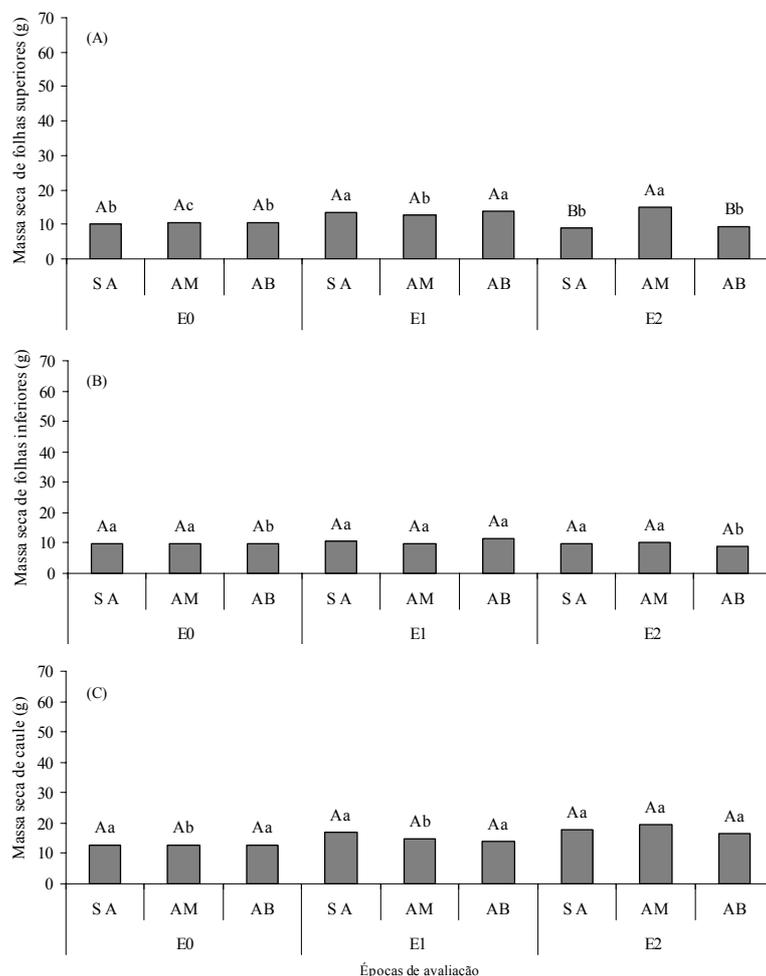


FIGURA 5 Massa seca de folhas superiores (A), folhas inferiores (B) e caule (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

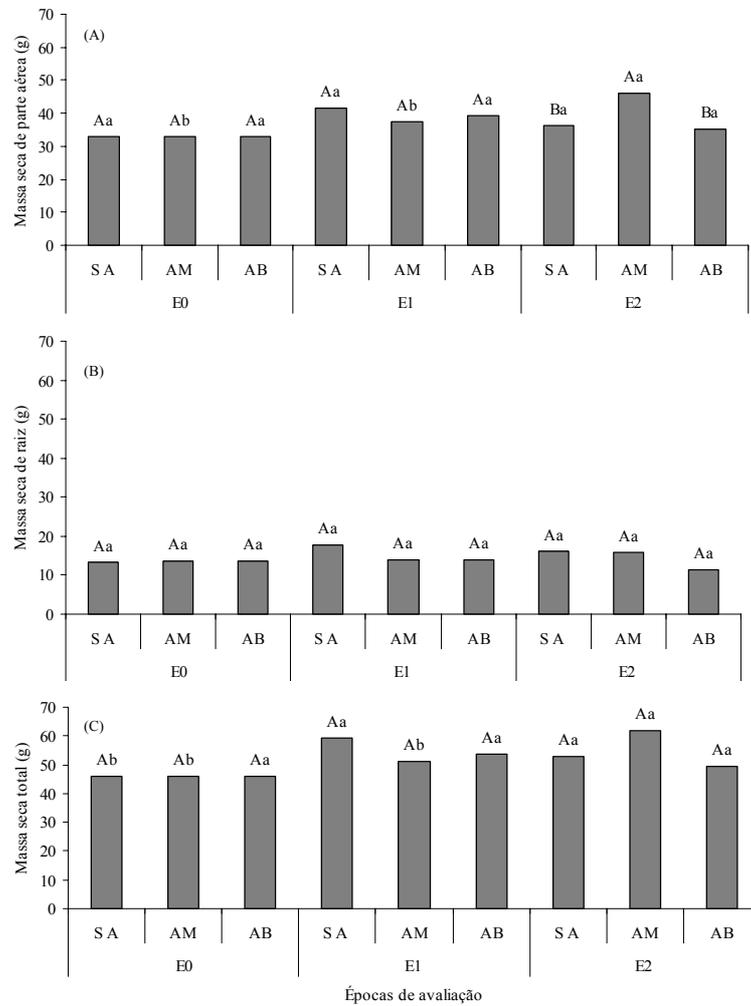


FIGURA 6 Massa seca de parte aérea (A), raiz (B) e total (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.2 Teor de clorofila total

Tanto nas folhas superiores quanto nas inferiores não foram observadas diferenças significativas nos teores de clorofila total entre os tratamentos (Figura 7). Entretanto observa-se que com o desenvolvimento das plantas houve um aumento no teor de clorofila nas folhas superiores das plantas aneladas na parte mediana do caule, já na segunda avaliação (E1). Esses dados revelam que as folhas superiores dessas plantas tiveram uma aceleração na síntese de clorofila, o que acompanhou o aumento em massa seca dessas folhas (Figura 5A).

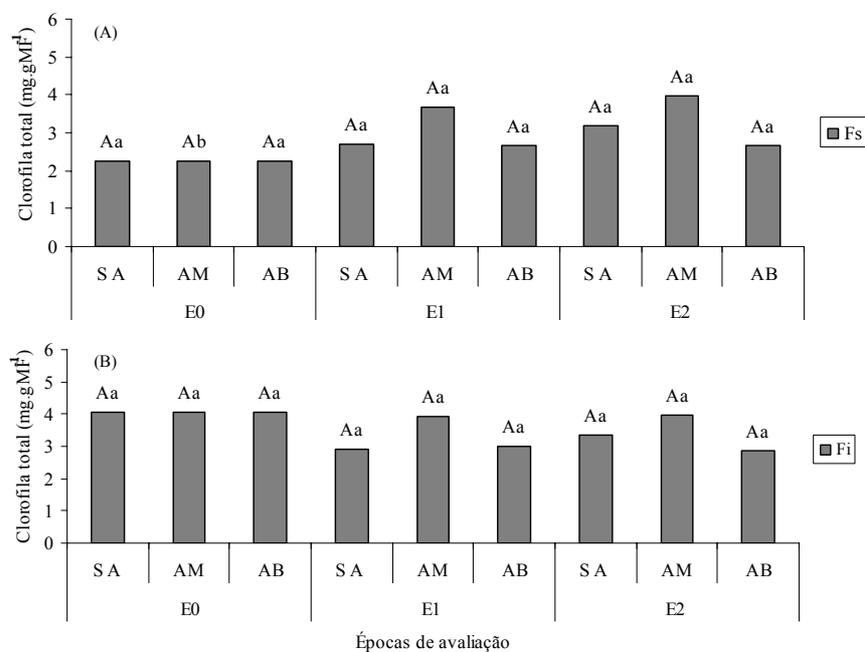


FIGURA 7 Teor de clorofila em folhas da metade superior (A) e inferior (B) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.3 Atividade das enzimas sacarolíticas

A invertase ácida apresentou, na primeira e na segunda época de avaliação, o mesmo comportamento para os três tratamentos (Figuras 8A e B). Entretanto, na primeira avaliação, as maiores atividades ocorreram nas folhas, comparativamente às raízes. Na segunda avaliação, a atividade dessa enzima nas folhas superiores caiu ao nível das raízes, fazendo com que as folhas inferiores mostrassem maior atividade (Figuras 8B e 9A), com maiores valores em plantas aneladas na parte mediana do caule. Na terceira época já se observou diferenças entre os tratamentos onde o anelamento do caule provocou uma queda na atividade da enzima nas folhas, permanecendo, as inferiores com maiores valores (Figura 8C).

A menor atividade da invertase ácida em plantas aneladas, quando comparadas com as testemunhas, pode ser decorrente de uma diminuição do ritmo de crescimento dessas plantas em função do anelamento (Sartori & Ilha, 2005). Em plantas que a retirada do anel se deu na base do caule, essa menor atividade da invertase ácida refletiu em uma menor incorporação de massa seca tanto em folhas superiores quanto inferiores na terceira época de avaliação (Figura 5A e 5B). Já em plantas com anelamento na parte mediana do caule, a diminuição da atividade da invertase ácida em folhas inferiores pode estar relacionada com o crescimento das brotações que surgiram abaixo da região anelada (Figura 3C), que representam um dreno com maior força relativa.

De um modo geral, a maior atividade da invertase ácida em folhas inferiores, possivelmente está relacionada com uma preparação da célula para a expansão dos folíolos, resultando em uma maturação gradual, uma vez que cada unidade fonte-dreno desenvolve-se a partir de folhas da metade inferior para a superior (Peluzio et al., 1999). Com base, nesses resultados pode-se inferir que, durante o período experimental, as folhas da metade inferior representaram drenos com maior força relativa. Em plantas aneladas na parte mediana do caule,

essa maior atividade da invertase ácida nas folhas inferiores, pode ser um sinal de um maior investimento da planta para recuperar a superfície assimilatória abaixo da região de anelamento. A invertase ácida contribui em destaque para a importação de sacarose, especialmente durante a expansão do crescimento em diversas estruturas drenos, como pontas de raízes, gemas e folhas em desenvolvimento (Sturm & Tang, 1999; Andersen et al., 2002; Weschke et al., 2003).

Nas duas primeiras épocas de avaliação não foram observadas diferenças na atividade da invertase ácida nas raízes em relação aos tratamentos. Entretanto, na última avaliação, as plantas aneladas apresentaram uma menor atividade quando comparadas às testemunhas (Figura 9C). Isso pode ser devido a uma maior demanda por carboidratos para as brotações que estão se desenvolvendo nessas plantas (Figura 3C), em relação às raízes. Já a menor atividade da invertase ácida nas raízes, pode ser evidenciada pela manutenção da massa seca com o decorrer do experimento, mostrando um baixo ritmo de crescimento (Figura 6B).

Quanto à invertase neutra, de um modo geral, sua atividade apresentou valores inferiores a da invertase ácida e não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 10). Logo em seguida à aplicação do anelamento, verificou-se que as plantas apresentaram a seguinte ordem de distribuição decrescente de atividade: folhas superiores, inferiores e raízes (Figura 10A). Na segunda época de avaliação, as folhas inferiores apresentaram um aumento na sua atividade em relação à época anterior (Figura 11B), com maiores valores para a testemunha (SA) e plantas aneladas na parte mediana do caule (Figura 10). Já no final do período experimental, observou-se uma nova queda na atividade dessas plantas, enquanto que para aquelas com anelamento na base do caule não foram observadas diferenças estatísticas com o decorrer do experimento (Figura 11).

A menor atividade da invertase neutra em relação à invertase ácida, já era esperada, uma vez que em plantas jovens observam-se altas taxas de crescimento, sobressaindo à atividade da invertase ácida. Sua atividade pouco se alterou em decorrência do anelamento, talvez por ser considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação da sacarose visando manter as concentrações de hexoses no citosol (Albertson et al., 2001).

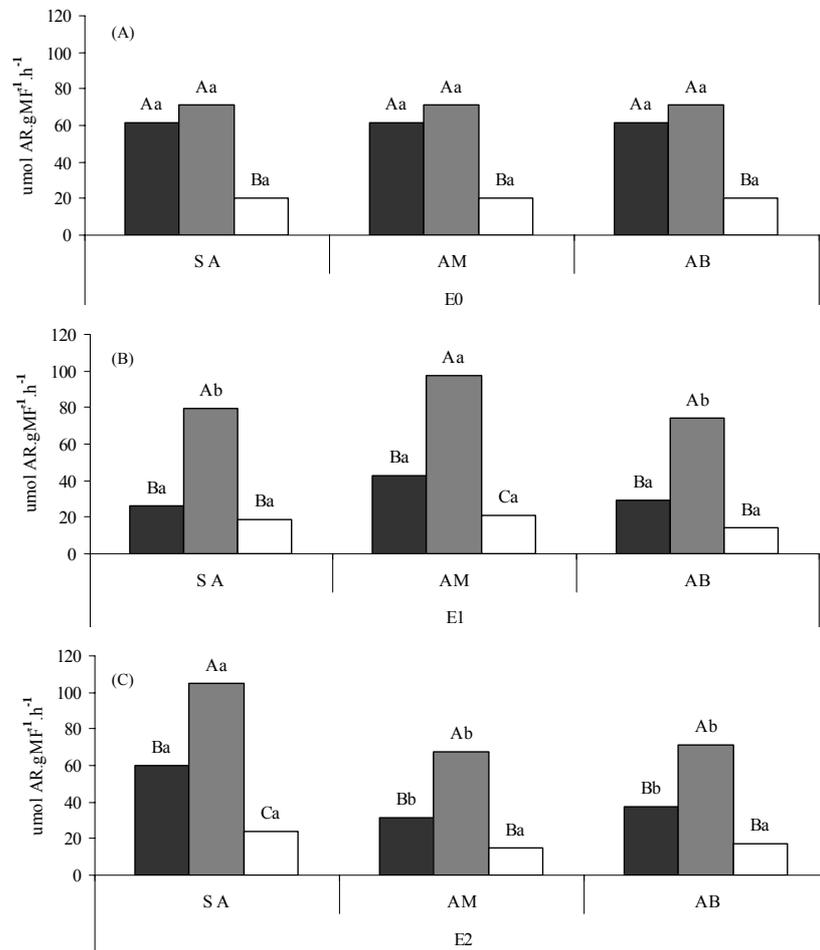


FIGURA 8 Atividade da invertase ácida em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (■) Folhas da metade superior, (▒) folhas da metade inferior, (□) raiz, (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tecidos em cada tratamento, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada órgão nos diferentes tipos de anelamento, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

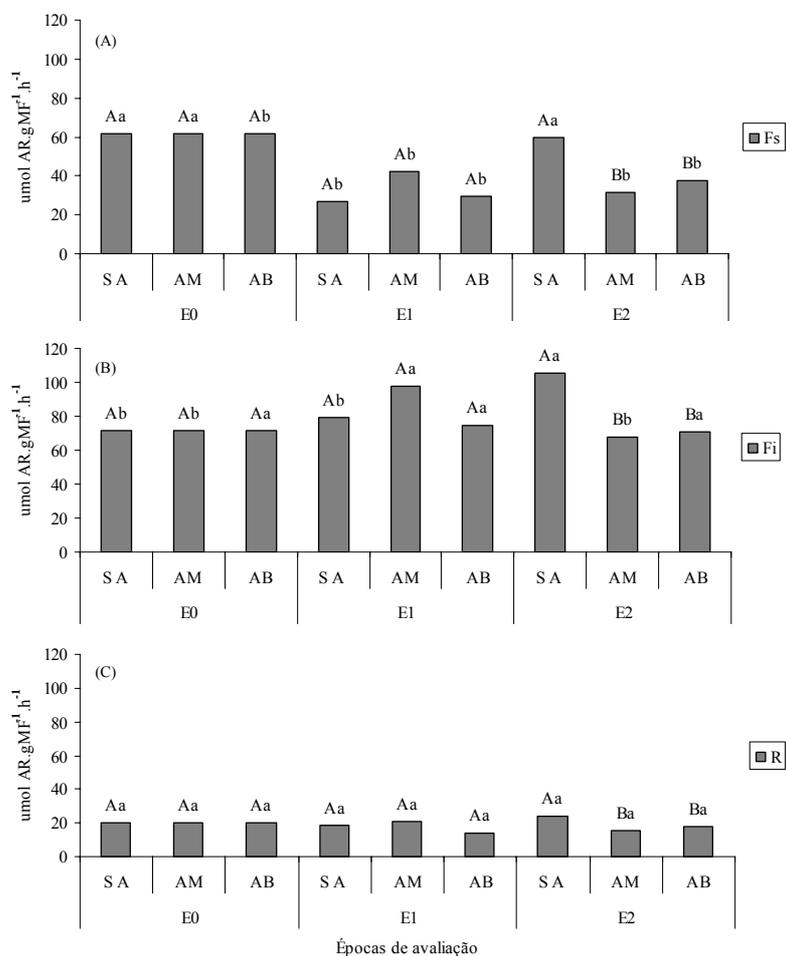


FIGURA 9 Atividade da invertase ácida em folhas superiores (A), inferiores (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e com anelamento na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

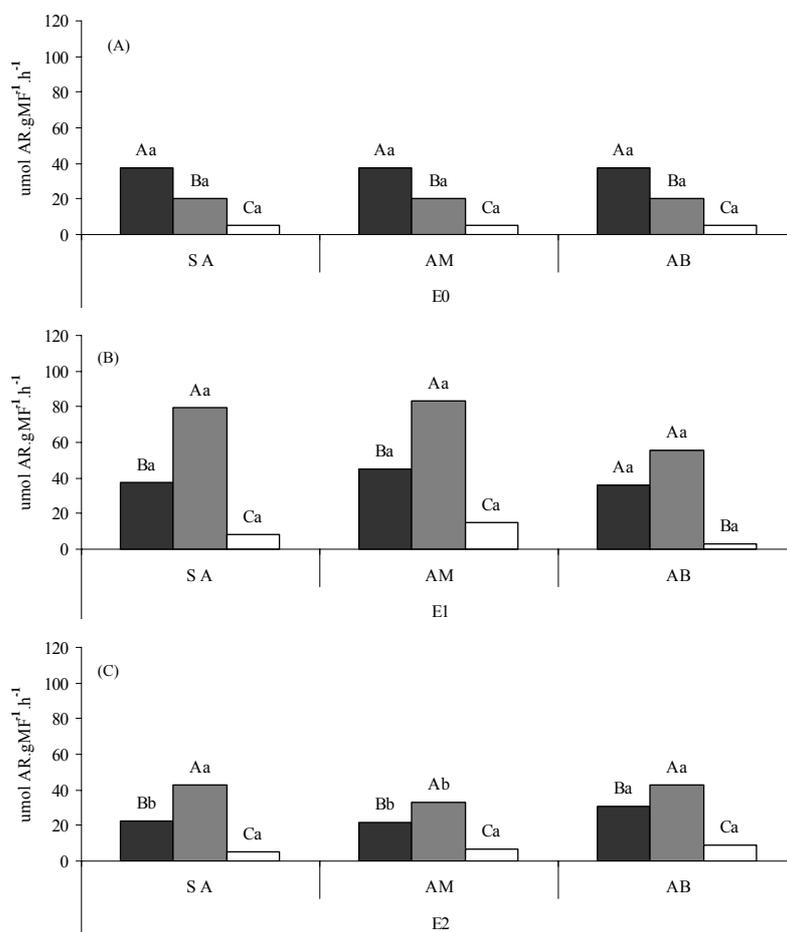


FIGURA 10 Atividade da invertase neutra em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (■) Folhas da metade superior, (■) folhas da metade inferior, (□) raiz, (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tecidos em cada tipo de anelamento, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada órgão nos diferentes tipos de anelamento, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

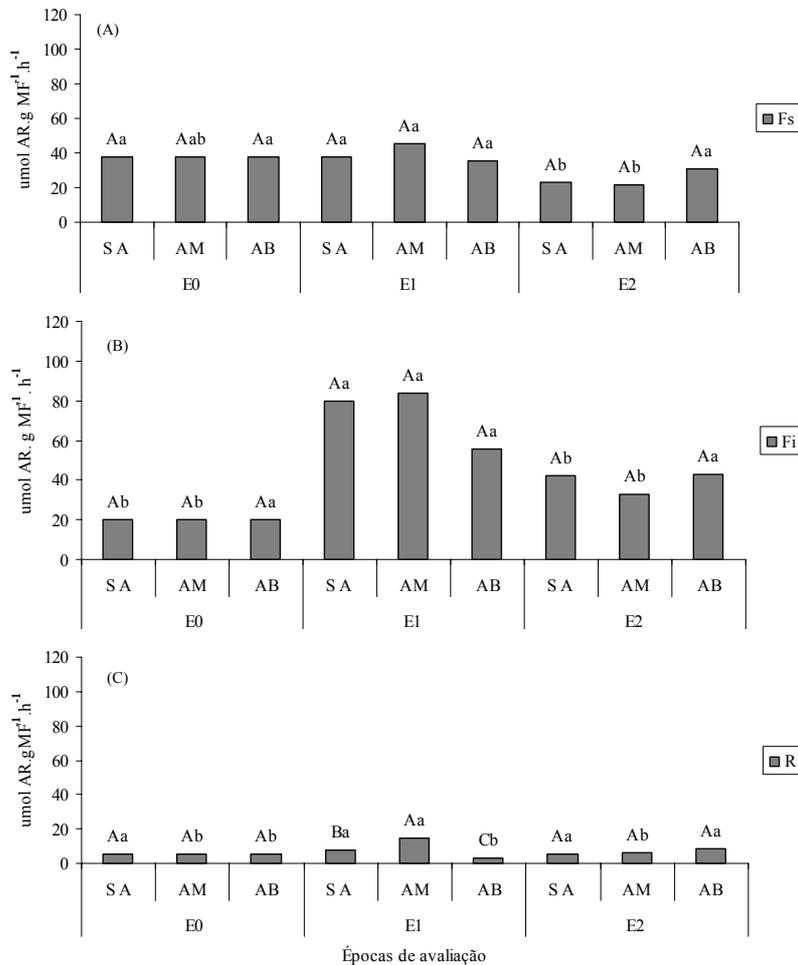


FIGURA 11 Atividade da invertase neutra em folhas superiores (A), inferiores (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em relação à sacarose sintase (SuSy), outra enzima da rota sacarolítica, na primeira época de avaliação, sua maior atividade foi encontrada em folhas quando comparadas com as raízes (Figura 12A). Já na segunda avaliação as plantas sem anelamento do caule (SA) apresentaram uma maior atividade em folhas da metade inferior (Figura 12B), devido a diminuição na atividade da SuSy em folhas superiores (Figura 13A). Entretanto as plantas aneladas mantiveram o mesmo padrão, quando comparadas a primeira época (Figura 12A). Na última época de avaliação, a atividade da SuSy se alterou em relação à anterior, com maior atividade tanto em folhas superiores quanto inferiores nas testemunhas, e com maiores valores em folhas inferiores para plantas aneladas (Figura 12C). Em plantas que sofreram a retirada do anel na base do caule, na segunda e última época de avaliação foram observados os maiores valores para a atividade da SuSy em folhas da porção inferior, em relação aos demais tratamentos (Figura 13C).

Já em raízes, a atividade da SuSy apresentou valores muito baixos em comparação às folhas, (Figura 13C), sugerindo que a rota sacarolítica via invertases foi a que prevaleceu nesse órgão.

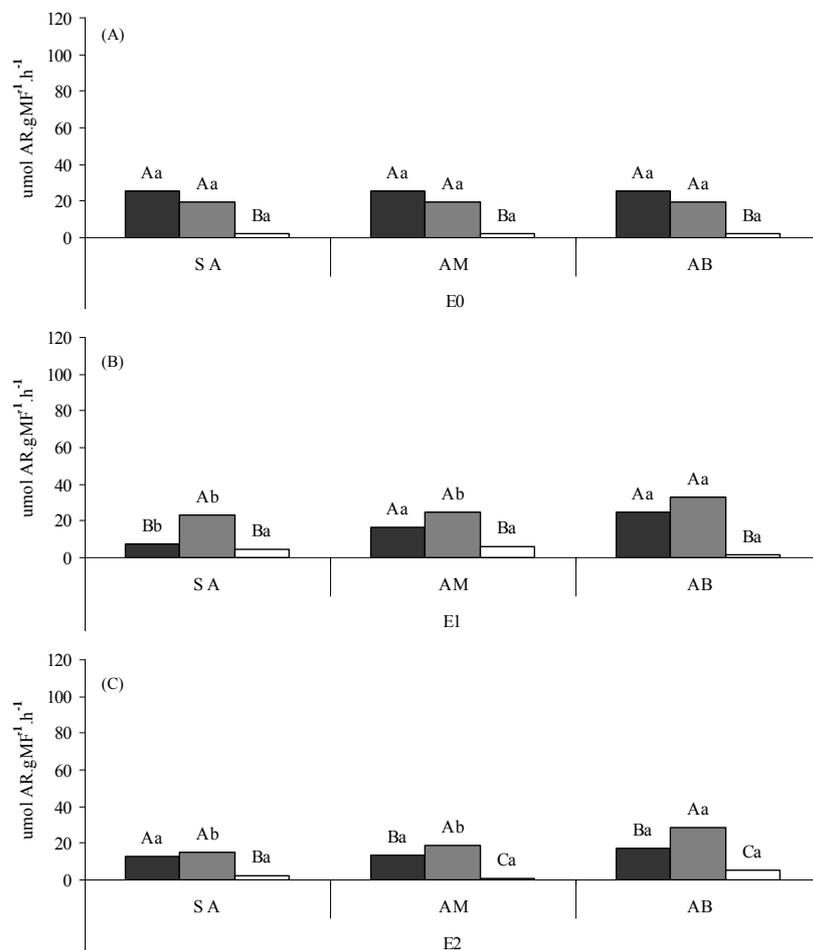


FIGURA 12 Atividade da sintase da sacarose (SuSy) em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (■) Folhas da metade superior, (▒) folhas da metade inferior, (□) raiz, (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tecidos em cada tipo de anelamento, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada órgão nos diferentes tipos de anelamento, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

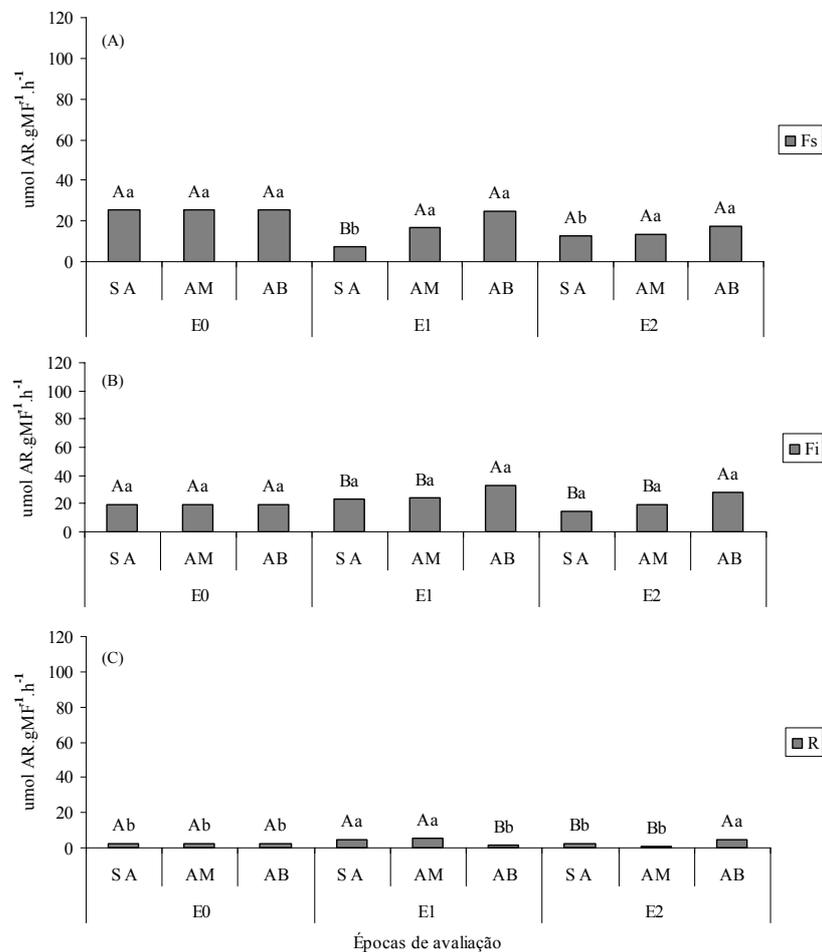


FIGURA 13 Atividade da sacarose sintase (SuSy) em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e com anelamento na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.4 Carboidratos

Em relação aos carboidratos, observa-se que após a primeira época de avaliação, houve um aumento nos teores de açúcares solúveis totais tanto em folhas superiores quanto inferiores de plantas com anelamento na base do caule (AB) (Figura 14A e B). Esse aumento representa uma resposta direta à prática de anelamento, que leva a um acúmulo de carboidratos acima da região anelada (Chun-Yao et al., 2003; Sartori & Ilha, 2005). Por outro lado, foi observado um decréscimo nos teores de açúcares solúveis totais em raízes das plantas que sofreram o anelamento (Figura 14C). Em plantas aneladas na base do caule essa diminuição se deve ao impedimento a translocação de fotoassimilados das folhas para as raízes em função do anelamento, e ao metabolismo respiratório (Chun-Yao et al., 2003). Já em plantas com anelamento na parte mediana do caule, provavelmente, se deve ao surgimento de um novo dreno representado pelas brotações, assim como também ocorreu em plantas aneladas na base do caule. Na última avaliação, os teores de açúcares solúveis totais caíram em folhas de plantas com anelamento na base do caule, fazendo se igualar aos níveis das demais (Figura 14A e B), provavelmente, em resposta a senescência de algumas folhas observada nesse período.

Quanto aos açúcares redutores, de um modo geral, só foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos em folhas da porção superior (Figura 15). Nas duas últimas avaliações, as plantas que sofreram anelamento apresentaram um aumento gradual nos teores de açúcares redutores em folhas superiores, com maiores valores encontrados em plantas aneladas na base do caule (Figura 15A). Esse aumento pode estar relacionado com uma preparação para expansão dos folíolos, em decorrência de uma aceleração do desenvolvimento em função do anelamento (Sartori & Ilha, 2005).

Os teores de amido apresentaram uma brusca queda na segunda avaliação, em relação à primeira, para todos os tratamentos, tanto em folhas quanto em raízes (Figura 16). Entretanto, em folhas da porção inferior, plantas com anelamento na base do caule apresentaram os maiores teores de amido, sendo que esse comportamento estendeu-se até a última avaliação para as folhas da porção superior (Figura 16B). Este maior acúmulo de amido em folhas da porção inferior também representa um efeito direto do anelamento do caule (Chun-Yao et al., 2003). Já as demais plantas mantiveram seus teores de amido na última avaliação. A manutenção de baixos teores de amido em plantas testemunha e com anelamento na parte mediana do caule pode estar ligado ao maior ritmo de crescimento dessas plantas em comparação as plantas aneladas na base do caule (Figura 3A).

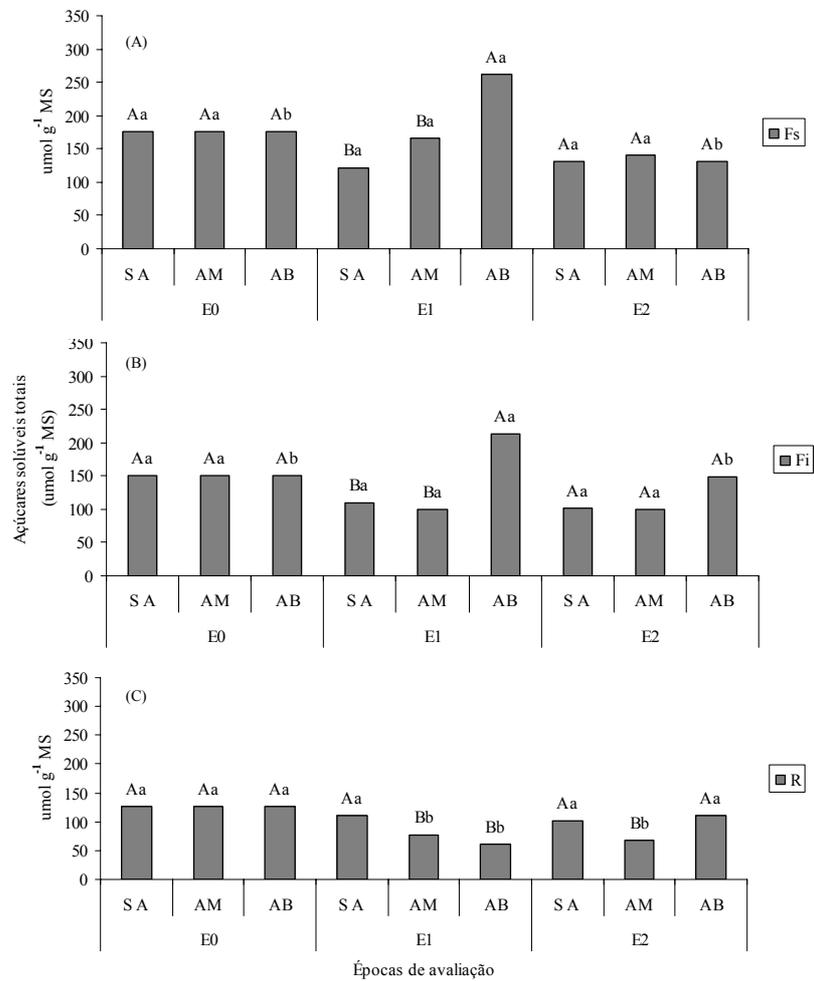


FIGURA 14 Teores de açúcares solúveis totais em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

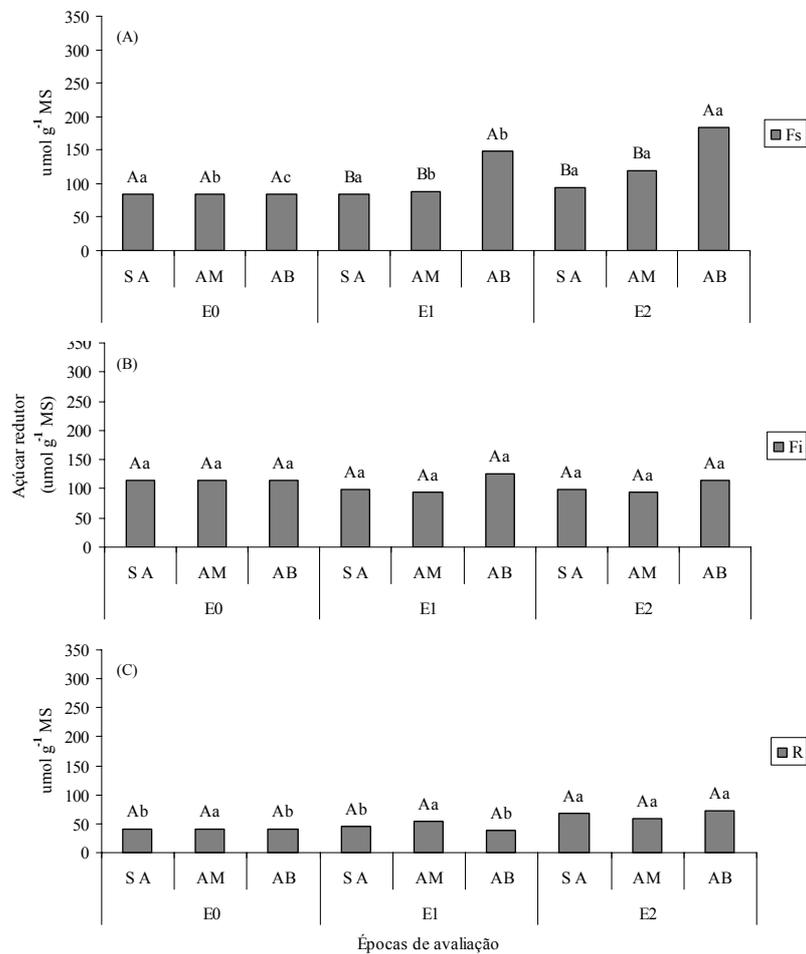


FIGURA 15 Teores de açúcares redutores em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

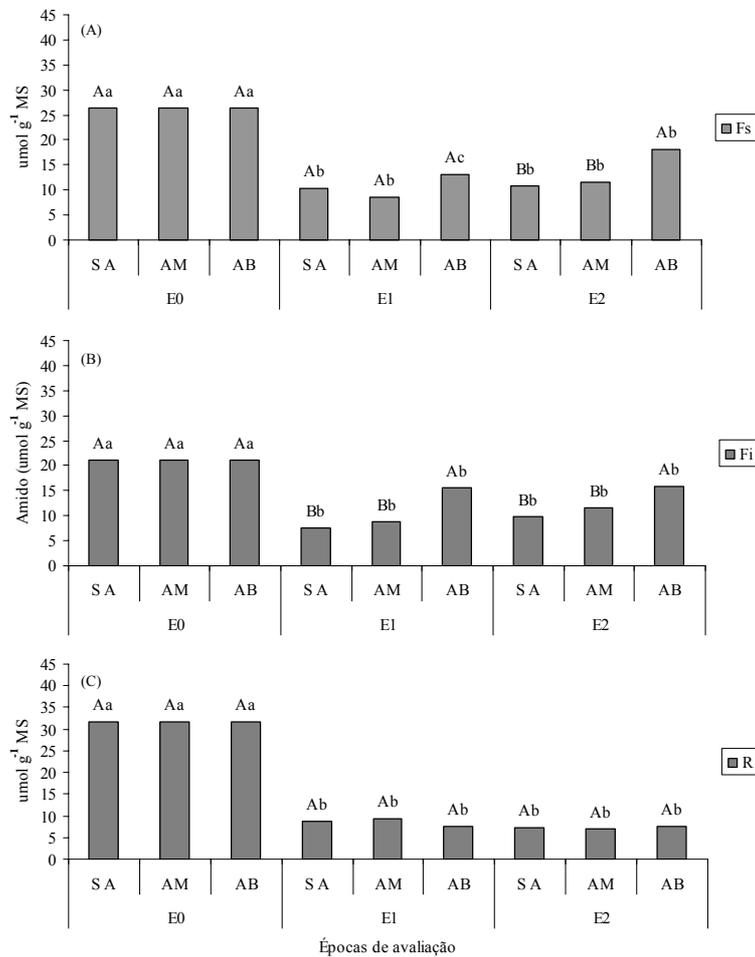


FIGURA 16 Teores de amido em folhas da metade superior (A), inferior (B) e raízes (C) de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.5 Atividade da redutase do nitrato

De um modo geral a redução do nitrato ocorreu preferencialmente em folhas, uma vez que estas apresentaram maiores valores para a atividade da redutase do nitrato. Cunha (2003) estudando o comportamento fisiológico de plantas de ingá sob condições de alagamento encontrou o mesmo comportamento em plantas que não foram submetidas a essa condição. Contrariamente, Torres (2003) observou um grande acúmulo de nitrato nas folhas do ingá, mas uma maior atividade da redutase do nitrato nas raízes quando comparada à atividade das folhas.

Na primeira época de avaliação, a assimilação do nitrato em mudas de ingá ocorreu preferencialmente em folhas da metade inferior, por apresentarem uma maior atividade da enzima redutase do nitrato (Figura 21A).

A maior atividade da redutase do nitrato em folhas inferiores pode ser explicada por se tratarem de folhas ainda jovens, mas desenvolvidas, apresentando mais energia disponível para a assimilação do nitrato, enquanto que as folhas da metade superior, por serem recém formadas, necessitam de grande quantidade de energia para o seu desenvolvimento. Em folhas recém formadas, a capacidade fotossintética assume valores baixos, por interceptarem menos radiação, seus cloroplastos não estarem totalmente formados e o trabalho de carboxilação ainda não ter atingido sua capacidade máxima (Larcher, 2004).

As plantas sem anelamento (SA) apresentaram um aumento na atividade da redutase do nitrato em folhas superiores nas épocas de avaliações subsequentes (Figura 22A), com maiores valores que as folhas inferiores e as raízes (Figuras 21B e 21C). Essa queda na atividade de folhas inferiores pode estar relacionada à senescência natural de algumas folhas apresentada por essas plantas.

As reações catalisadas pelas enzimas redutase do nitrito e sintase do glutamato (GOGAT) exigem a redução da ferredoxina, que é feita pelo sistema

de transporte não-cíclico de elétrons (Crawford, 1995). Assim, uma maior taxa fotossintética, concomitante a uma maior produção de poder redutor, o qual é necessário para que as reações de redução do nitrato a aminoácidos ocorram, resulta em uma maior atividade da enzima redutase do nitrato.

O anelamento do caule afetou a atividade da redutase do nitrato nas plantas uma vez que estas não apresentaram o mesmo comportamento que testemunhas (SA). Na segunda época de avaliação, as plantas aneladas apresentaram uma maior atividade da redutase do nitrato em folhas inferiores, assim como na primeira época (Figura 21B). Em plantas aneladas na parte mediana do caule (AM), essa maior atividade em folhas da metade inferior, provavelmente está ligada ao fato dessas folhas servirem de fonte para as brotações que estão se desenvolvendo abaixo desse ponto. Por outro lado, o anelamento na base do caule afetou a atividade da enzima nas folhas superiores, possivelmente por causar uma desaceleração no seu desenvolvimento, evidenciado pela manutenção do teor de clorofila (Figura 7A). Já na terceira época de avaliação não houve diferença significativa entre os diferentes tecidos nas plantas que sofreram o anelamento (Figura 21C). Tal fato indica que as folhas das porções superiores e inferiores atingiram um mesmo grau de maturação, não apresentando diferenças em relação à redução do nitrato.

As plantas sem anelamento do caule apresentaram maiores valores para a atividade da redutase do nitrato radicular na segunda época de avaliação, seguida por uma queda na última época (Figura 18C). Essa queda na atividade da enzima coincidiu com o período em que as plantas estavam repondo as folhas perdidas pela senescência natural. No decorrer do desenvolvimento de uma planta, quando há a emissão de uma nova folha, grande parte dos carboidratos é direcionada para o desenvolvimento do novo órgão. Paralelamente, há uma diminuição na taxa de translocação desses compostos para o sistema radicular, diminuindo a disponibilidade de energia nas raízes, o que reduz a taxa de

assimilação de nitrogênio (Vessey *et al.*, 1990; Bredemeier & Mundstock, 2000).

Já o anelamento do caule provocou uma resposta diferenciada nas plantas quanto à atividade enzimática radicular (Figura 18C). Embora o anelamento altere a taxa de translocação de carboidratos para as raízes, plantas aneladas na parte mediana do caule (AM) não apresentaram diferenças significativas na atividade enzimática radicular com o decorrer do experimento (Figura 18C). Isso pode ser resultado de um abastecimento das raízes com fotoassimilados oriundos das folhas que permaneceram abaixo da região de anelamento, mantendo os níveis da atividade enzimática nas raízes.

Já as plantas com anelamento na base do caule (AB), apresentaram uma maior atividade enzimática radicular nas duas últimas épocas de avaliação (Figura 18C). O que pode ser explicado pelo fato das raízes representarem a única fonte disponível para as brotações que estão se desenvolvendo na base da planta, abaixo da região anelada. Essa maior atividade da redutase do nitrato nas raízes resultou em grande consumo de suas reservas, o que fez cair drasticamente o teor de amido (Figura 16C). Contrariamente, Queiroz *et al.* (1992) observaram uma diminuição na atividade da redutase do nitrato nas raízes do cafeeiro submetido ao anelamento do caule, sugerindo que o processo de redução foi limitado pela disponibilidade de fotoassimilados.

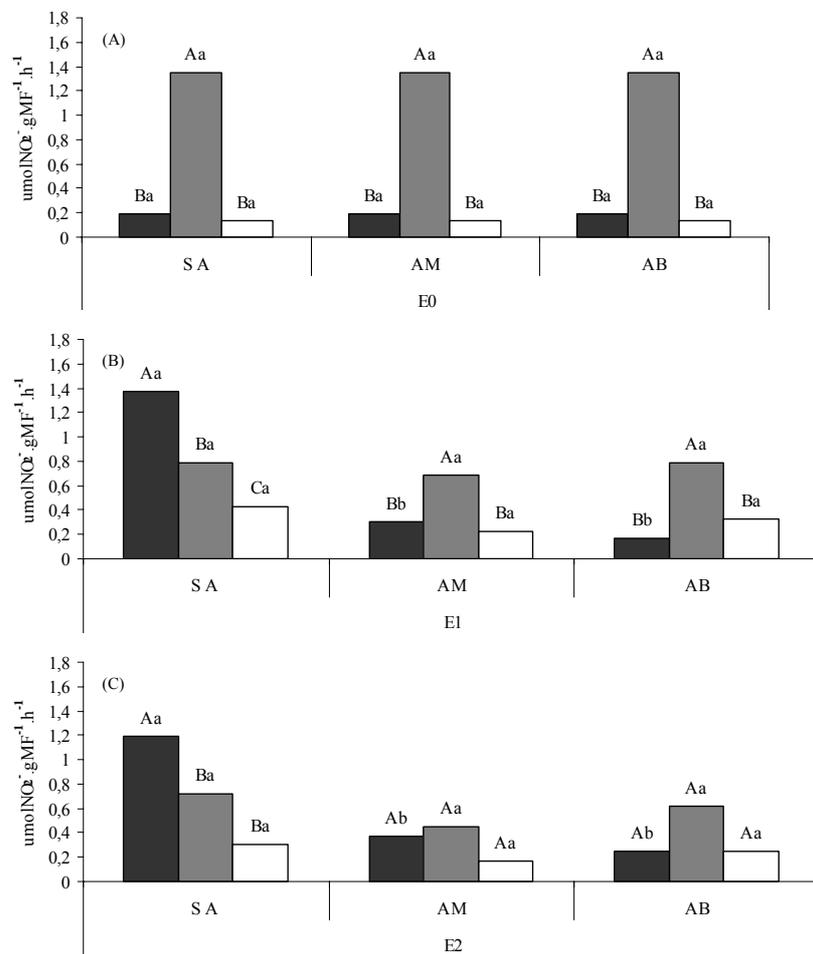


FIGURA 17 Atividade da redutase do nitrato em diferentes órgãos de plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (■) Folhas da metade superior, (▣) folhas da metade inferior, (□) raiz, (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tecidos em cada tipo de anelamento, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada órgão nos diferentes tipos de anelamento, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

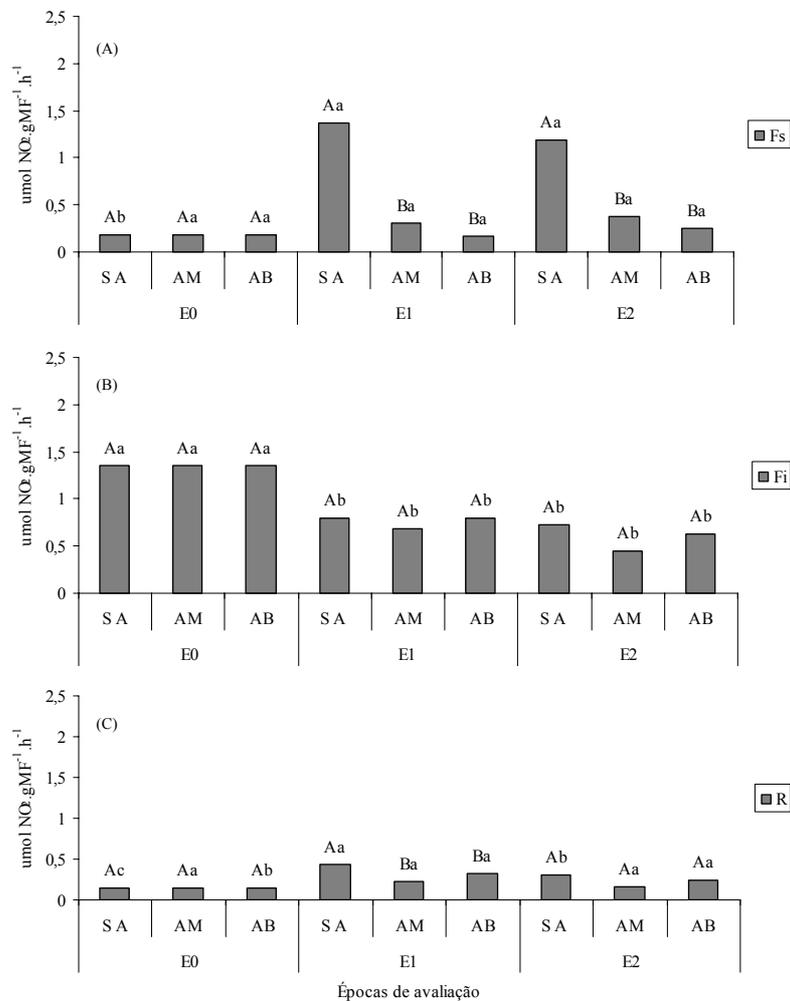


FIGURA 18 Atividade da redutase do nitrato em plantas sem anelamento do caule (SA), com anelamento na parte mediana do caule (AM) e na base do caule (AB) em diferentes épocas: (E0) logo após o anelamento, (E1) início das brotações abaixo da região anelada, (E2) brotações com as primeiras folhas em expansão. Letras maiúsculas comparam médias dos tratamentos dentro de cada época de avaliação, enquanto letras minúsculas comparam médias de cada tratamento no decorrer das épocas, com base no teste de Skott-Knott ($p \leq 0,05$).

5 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o anelamento do caule do ingazeiro, por um período de um mês, não afetou o desenvolvimento total das plantas, sendo a massa seca de folhas superiores determinante para o aumento na massa seca total ao final do experimento. O anelamento acelerou a síntese de clorofila em folhas da metade superior, e acentuou a senescência de folhas inferiores, quando o anelamento foi realizado na base do caule. Por se tratarem de plantas ainda em desenvolvimento, foi encontrada maior atividade da invertase ácida em relação à invertase neutra, principalmente em folhas inferiores. Em relação à redutase do nitrato, o anelamento afetou a atividade da enzima já na segunda avaliação, onde as testemunhas apresentaram maior atividade em folhas superiores, enquanto que nas plantas aneladas essa maior atividade foi encontrada nas folhas da metade inferior. De um modo geral, entre as plantas aneladas, as que sofreram o anelamento na parte mediana do caule se comportaram de maneira semelhante à testemunha, enquanto que as aneladas na base foram as que mais se diferenciaram.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, P. L.; PETERS, K. F.; GROF, C. P. L. An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 4, p. 323-328, Apr. 2001.

ALVES, J. D. Morfologia do cafeeiro. In: CARVALHO, C. H. S. **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 2008, 334p.

ANDERSEN, M. N.; ASCH, F.; WU, Y.; JENSEN, C. R.; NAESTED, H.; MOGENSEN, V. O.; KOCH, K. E. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. **Plant Physiology**, California, v. 130, n. 2, p. 591-604, Oct. 2002.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolates chloroplasts. Polyfenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Califórnia, v.24, n.1, p.1-15, Jan. 1949.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, abr. 2000.

CAIRO, P. A. R. **Variação sazonal da atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise da sacarose em plantas de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. Adr. de Juss.) Muell.-Arg], em Lavras, MG. 2007. 64p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.**

CHUN-YAO, L.; WEISS, D.; GOLDSCHMIDT E. E. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternative-bearing citrus trees. **Annals of Botany**, Exeter, v. 92, n. 1, p. 137-143, May 2003.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 7, n. 7, p.859-868, July 1995.

CUNHA, R. B. **Fotossíntese, assimilação do nitrogênio e metabolismo anaeróbico em plantas de ingá (*Inga vera* Willd.) durante períodos de submersão total e pós submersão**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CUTTING, J. G. M.; LYNE, M. C. Girdling and the reduction in shoot xylem sap concentrations of cytokinins and gibberellins in peach. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 68, n. 4, p. 619-626, 1993.

DANN, I. R.; JERIE, P. H.; CHALMERS, D. J. Short term changes in cambial growth and endogenous IAA concentrations in relation to phloem girdling of peach, *Prunus persica* (L.) Batsch. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 12, n. 4, p. 395-402, Aug. 1985.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-520.

DUARTE, T. S.; PEIL, R. M. N.; MONTEZANO, E. M. Crescimento de frutos do meloeiro sob diferentes relações fonte: dreno. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 342-347, set. 2008.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.

HAMADA, K.; OGATA, T.; FUJIWARA, S.; HASEGAWA, K. Healing process of the wounds of the branches of the Japanese persimmon that were caused by girdling, scoring, and strangulation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 276-281, Apr. 2009.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 43, n. 6, p. 1274-1279, 1971.

KOCH, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 235-246, June 2004

KOSTER, A.L. Changes in metabolism of isolated root systems of soybean. **Nature**, London, v. 198, p. 709-710, May 1963.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rimas, 2004. 531 p.

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; LIMA, G. P. P.; SILVA, M. A. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 718-725, maio/jun. 2009

LI, W. G.; WANG, J. L.; SHEN, J. J.; WANG, J. B. Nitrate reduction in ramets of a clonal plant *Eichhornia crassipes* responding to nitrate availability during clonal growth stage. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, n. 1, p. 171-174, Mar. 2009.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640p.

MEDRADO, M. J. S.; DALZOTO, D. N.; OLIZESKI, A.; MOSELE, S. H. **Recuperação de ervais degradados**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. (Comunicado técnico, 86).

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 345-365, 1985.

OLIVEIRA, D. P. O.; L. E. M.; DELÚ FILHO, N. Optimization of invertase assay conditions in rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* muell. arg.) **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 687-692, 2006.

PELUZIO, J. M.; CASALI, V. W. D.; LOPES, N. F.; MIRANDA, G. V.; SANTOS, G. R. Comportamento da fonte e do dreno em tomateiro após a poda apical acima do quarto cacho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 510-514, jul./set. 1999

QUEIROZ, C. G. S.; RENA, A. B.; CORDEIRO, A. T.; ALVES, J. D. Efeitos da excisão da parte aérea, remoção de folhas e anelamento do caule sobre a atividade da redutase do nitrato nas raízes do cafeeiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 55-57, 1992.

RADIN, J. W.; PARKER, L. L.; SELL, C. Partitioning of sugar between growth and nitrate reduction in cotton roots. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 62, n. 4, p.550-553, Oct. 1978.

RIBEIRO, F. de A.; COUTO, L.; GOMES, J. M.; BORGES, R. de C. G. Influência da anelagem e reguladores de crescimento na indução de brotação de cepas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 16, n. 3, p. 247-254, 1992.

RODRÍGUEZ, C. ***Inga vera* (Willd.)**: Guaba. Leguminosae (Mimosoideae). Legume family. New Orleans: USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station, Institute of Tropical Forestry; 1990. (Personal communication).

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.

RUAN, Y. L.; LLEWELLYN, D. J.; FURBANK, R. T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation and seed development. **Plant Cell**, Waterbury, v. 15, n. 4, p. 952-964, Apr. 2003.

SANTIN, D.; WENDLING, I.; BENEDETTI, E. L.; BRONDANI, G. E.; REISSMANN, C. B.; MORANDI, D.; ROVEDA, L.F. Poda e anelamento em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) visando à indução de brotações basais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 56, p. 97-104, jan/jun. 2008.

SARTORI, I. A.; ILHA, L. L. H. Anelamento e incisão anelar em fruteiras de caroço. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 724-729, mai/jun 2005.

STURM, A. Invertases. Primary structure, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 121, n. 1, p. 1-7, Jan. 1999.

STURM, A.; CHRISPPEELS, M. J. DNA cloning of carrot extracellular frutoidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, Waterbury, v. 2, n. 6, p. 1107-1119, June 1990.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 10, p. 401-407, Oct. 1999.

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

TORRES, J. A. P. **Aspectos da fotossíntese e da assimilação do nitrogênio em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TROUVERIE, J.; CHATEAU-JOUBERT, S.; THÉVENOT, C.; JACQUEMOT, M.; PRIOUL, J. Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 5, p. 894-905, Sept. 2004.

VATTUONE, M. A.; PRADO, F. E.; SAMPIETRO, A. R. Cell wall invertases from sugarcane. **Phytochemistry**, New York, v. 20, n. 2, p. 189-191, 1981.

VESSEY, J. K.; RAPER, C. D.; HENRY, L. T. Cyclic variations in nitrogen uptake rate in soybean plants: uptake during reproductive growth. **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 41, n. 12, p.1579-1584, Dec. 1990.

WESCHKE, W.; PANITZ, R.; GUBATZ, S.; WANG, Q.; RADCHUK, R.; WEBER, H.; WOBUS, U. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 395-411, Jan. 2003.

WINTER, H.; HUBER, S. S. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 35, n. 4. p. 253-289, 2000.

YAO, S.; KODAMA, R.; WANG, H.; ICHII, M.; TAKETA., S.; YOSHIDA, H. Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 5, p. 627-634, May 2009.