



**POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO**

**METABOLISMOS DO NITROGÊNIO E  
ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE  
SERINGUEIRA (*Hevea* spp) SUBMETIDAS À  
BAIXA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO NA  
PRESENÇA DE NITRATO E/OU AMÔNIO**

**LAVRAS - MG**

**2012**

**POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO**

**METABOLISMOS DO NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM  
PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea spp*) SUBMETIDAS À  
BAIXA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO NA PRESENÇA DE  
NITRATO E/OU AMÔNIO**

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

Orientador

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

**LAVRAS - MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Carvalho, Pollyanna Aparecida de.

Metabolismos do nitrogênio e antioxidante em plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*) submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio na presença de nitrato e/ou amônio / Pollyanna Aparecida de Carvalho. – Lavras : UFLA, 2012.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Estresse. 4. Alagamento. 5. Assimilação de nitrogênio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.950413354

**POLLYANNA APARECIDA DE CARVALHO**

**METABOLISMOS DO NITROGÊNIO E ANTIOXIDANTE EM  
PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA (*Hevea spp*) SUBMETIDAS À  
BAIXA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO NA PRESENÇA DE  
NITRATO E/OU AMÔNIO**

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

APROVADA em 31 de Julho de 2012.

Dr. Antônio Cláudio Davide            UFLA

Dr. Nelson Delú Filho                UNIS

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2012**

**A Deus,**

***OFEREÇO***

**Aos meus pais, Sebastião e Marcia ,  
meu avô João e minhas irmãs Mariana e Jullyanna com amor,**

***DEDICO***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS, por me oferecer força em todas as horas;

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realizar a pós-graduação;

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

À Fapemig e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa;

Ao meu orientador, Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade;

Ao professor, Ladaslav Sodek, da Unicamp, pelas análises realizadas e pelo apoio e atenção.

Aos professores Nelson Delú, Antônio Cláudio Davide, Angêla Maria Soares e Sidnei Deuner, pela colaboração;

A minha mãe, Marcia, e ao meu pai, Sebastião pelo exemplo de vida, esperança, fé e coragem, obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim;

Ao meu avô João e as minhas irmãs Mariana e Jullyanna, pelas orações, pela ajuda e constante torcida;

As minhas amigas Ana Elisa e Marília que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis;

À Marilza, Patrícia Fabian, Meline, Helbert, Tina e Patrícia Lage que com certeza contribuíram para concretização desse trabalho.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal: Lena, Dartagnan, Evaristo, Joel, Odorêncio, por toda a ajuda;

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação.

**MUITO OBRIGADA!!!**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da baixa disponibilidade de oxigênio no substrato sobre as enzimas envolvidas na assimilação de nitrogênio e no sistema antioxidante de plantas jovens de seringueira cultivadas na ausência de nitrogênio e na presença de  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$ , bem como avaliar a interferência do alagamento e da fonte nitrogenada nos teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na seiva xilemática e na taxa fotossintética. Para atender ao objetivo, as plantas foram submetidas a oito tratamentos, sendo ausência nitrogênio ou presença de  $\text{NO}_3^-$  e/ou  $\text{NH}_4^+$  (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4 mM) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (com alagamento e sem alagamento). Aos 7, 14 e 21 dias após a indução do alagamento foram avaliadas às atividades enzimáticas da Redutase do nitrato (RN), Sintetase da Glutamina (GS), Glutamato sintase (NADH-GOGAT), Glutamato desidrogenase (GDH), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato peroxidase (APX), a concentração de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na seiva do xilema, a fotossíntese e a formação de aerênquimas. Os resultados mostraram que o crescimento em altura das plantas não diferiu em função da fonte nitrogenada. Plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  apresentaram maior crescimento em diâmetro. Ocorreu um aumento na atividade da RN em raízes de plantas alagadas cultivadas com 8 mM de  $\text{NO}_3^-$ . A atividade da GS, nas raízes, foi menor em plantas alagadas independente da fonte nitrogenada, entretanto nas folhas não ocorreram diferenças. Não foi detectada atividade da GOGAT nas plantas cultivadas sem nitrogênio, nas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  a atividade diminuiu quando essas foram submetidas ao alagamento, enquanto que nas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  a atividade da GOGAT foi favorecida pelo alagamento. A atividade da GDH em raízes de plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  foi menor nas plantas alagadas, o oposto ocorreu nas plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ . O teor de  $\text{NO}_3^-$  na seiva do xilema em plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  foi menor nas alagadas, o contrário ocorreu com o teor de  $\text{NH}_4^+$  nas plantas cultivadas com esse cátion. Quanto às respostas das enzimas do sistema antioxidante, não foram detectadas atividades da SOD, CAT e APX em raízes de seringueira. Entretanto nas folhas, observou-se que a atividade da SOD nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  foi maior nas plantas alagadas. O alagamento aumentou a atividade da APX em todos os tratamentos. As maiores taxas fotossintéticas foram observadas nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$ , com ou sem alagamento. O desenvolvimento de aerênquimas ocorreu de forma mais pronunciada e rápida em plantas alagadas nutridas com  $\text{NO}_3^-$ .

Palavras-chave: Assimilação de nitrogênio. Enzimas antioxidantes. *Hevea brasiliensis*. Estresse. Alagamento

## ABSTRACT

This work aimed the influence of low oxygen availability in the substrate over the enzymes involved in nitrogen assimilation and over the antioxidant system of young rubber tree plants grown in nitrate and/or ammonium, as well as evaluating the interference of flooding in the levels of nitric and ammoniacal N in xylem sap and in gas exchange. To attain the goal, the plants were subjected to eight treatments: the absence or presence of nitrate nitrogen and/or ammonium (0/0, 8/0, 0/8 and 4/4 mM) in two conditions of oxygen availability (with flooding and without flooding). Subsequently evaluating the concentration of nitrate and ammonium in the xylem sap, enzymatic activities of nitrate reductase (RN), Glutamine synthetase (GS), Glutamate synthase (NADH-GOGAT), Glutamate dehydrogenase (GDH), superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Ascorbate peroxidase (APX), the photosynthetic rate and the formation of aerenchyma 7, 14 and 21 days after the induction of flooding. The results showed that the increase in plant height did not differ depending on the nitrogen source. Plants grown with nitrate had higher diameter growth. There was an increase in the activity of nitrate reductase in roots of rubber trees in flooded plants grown with 8 mM nitrate. The GS activity in roots was lower in flooded plants regardless of the source; however there were no differences in the leaves. No GOGAT activity was detected in the plants grown in the absence of nitrogen. In plants cultivated with nitrate activity decreased when these were subjected to flooding, whereas in plants cultivated with ammonium GOGAT activity was favored by flooding. The GDH activity in roots of plants grown with nitrate was lower in flooded plants, the opposite occurred in plants grown with ammonium. The nitrate content of the xylem sap in plants grown with nitrate was lower in flooded, the opposite occurred with the concentration of ammonium in plants grown with this cation. We did not detect the presence of nitrate and ammonium in the sap of plants grown in the absence of these ions. Regarding the responses of antioxidant enzymes system, there were no activities of SOD, CAT and APX in roots of rubber. However the leaves showed that SOD activity in plants grown with nitrate was higher in flooded plants. Flooding increased the APX activity in all treatments. The highest photosynthetic rates were observed in plants grown with nitrate with or without flooding. The development of aerenchyma occurred in a more pronounced and faster fashion on flooded plants nourished only with silver nitrate.

Key-words: Nitrogen assimilation. Antioxidant enzyme. *Hevea brasiliensis*. Stress. Flooding.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Reações de assimilação das diferentes formas de aquisição do nitrogênio ..... 24
- Figura 2 Altura de plantas de seringueira avaliada aos 12 meses de idade em função da fonte e concentração de nitrogênio. As barras correspondem ao erro padrão da média de 8 repetições..... 44
- Figura 3 Diâmetro de plantas de seringueira avaliado aos 12 meses de idade em função da fonte e concentração de nitrogênio. As barras correspondem ao erro padrão da média de 8 repetições..... 44
- Figura 4 Taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (S A e C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições ..... 46
- Figura 5 Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (S A e C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições... 47

- Figura 6 Atividade da enzima Sintetase da Glutamina (GS) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 49
- Figura 7 Atividade da enzima Sintetase da Glutamina (GS) em folhas de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 49
- Figura 8 Atividade da enzima Sintase do glutamato (NADH-GOGAT) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 51
- Figura 9 Atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 52

- Figura 10 Atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 53
- Figura 11 Teor de amônio na seiva xilemática de plantas jovens de seringueira nutridas com apenas amônio na concentração de 8 mM ou com nitrato/amônio na proporção de 4/4 em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliado aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 54
- Figura 12 Teor de nitrato na seiva xilemática de plantas jovens de seringueira nutridas com apenas nitrato na concentração de 8 mM ou com nitrato/amônio na proporção de 4/4 em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliado aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 55
- Figura 13 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 57

- Figura 14 Atividade da enzima catalase (CAT) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - S A e com alagamento - C A) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 58
- Figura 15 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (S A e C A), avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições..... 59
- Figura 16 Formação de aerênquimas em secção transversal de raízes laterais de plantas jovens de seringueira cultivadas com 8 mM de Amônio e submetidas a duas condições de disponibilidade de oxigênio: sem alagamento (A, B e C) e com alagamento (D, E e F), avaliada em 7 (A e D), 14 (B e E) e 21 (C e F) dias após a indução do alagamento. A barra (←) corresponde a 100 µm..... 61
- Figura 17 Formação de aerênquimas em secção transversal de raízes laterais de plantas jovens de seringueira cultivadas com 8 mM de Nitrato e submetidas à duas condições de disponibilidade de oxigênio: sem alagamento (A, B e C) e com alagamento (D, E e F), avaliada em 7 (A e D), 14 (B e E) e 21 (C e F) dias após a indução do alagamento. A barra (←) corresponde a 100 µm..... 62

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Seringueira</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Metabolismo do nitrogênio</b> .....	17
<b>2.3</b>	<b>Alterações metabólicas e anatômicas de plantas sob hipoxia</b> .....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1</b>	<b>Avaliação de altura, diâmetro e fotossíntese</b> .....	36
<b>3.2</b>	<b>Atividade in vivo da redutase do nitrato (RN; E.C.1.6.6.1)</b> .....	36
<b>3.3</b>	<b>Obtenção dos extratos enzimáticos e avaliação da atividade da Sintetase da Glutamina (GS; E.C.6.3.1.2), glutamato sintase (GOGAT; E.C. 1.4.1.7) e glutamato desidrogenase (GDH; E.C.1.4.1.3)</b> .....	37
<b>3.4</b>	<b>Coleta da seiva do xilema</b> .....	38
<b>3.5</b>	<b>Quantificação de Nitrato na seiva do xilema</b> .....	39
<b>3.6</b>	<b>Quantificação de Amônio na seiva do xilema</b> .....	39
<b>3.7</b>	<b>Obtenção dos extratos enzimáticos e avaliação da atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1)</b> .....	40
<b>3.8</b>	<b>Avaliação Anatômica das raízes</b> .....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>4.1</b>	<b>Altura e diâmetro</b> .....	43
<b>4.2</b>	<b>Taxa fotossintética</b> .....	45
<b>4.3</b>	<b>Atividade da Redutase do nitrato (RN)</b> .....	46
<b>4.4</b>	<b>Atividade da sintetase da glutamina (GS)</b> .....	48
<b>4.5</b>	<b>Atividade da sintase do glutamato (NADH-GOGAT)</b> .....	50
<b>4.6</b>	<b>Atividade da glutamato desidrogenase (GDH)</b> .....	51
<b>4.7</b>	<b>Teores de amônio e nitrato na seiva do xilema</b> .....	53
<b>4.8</b>	<b>Atividade da superóxido dismutase (SOD)</b> .....	56
<b>4.9</b>	<b>Atividade da catalase (CAT)</b> .....	57
<b>4.10</b>	<b>Atividade da ascorbato peroxidase (APX)</b> .....	58
<b>4.11</b>	<b>Avaliação anatômica das raízes</b> .....	60
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A seringueira uma espécie nativa da Amazônia brasileira é explorada mundialmente, por ser a maior fonte natural de látex. Seu cultivo vem se difundindo para as regiões centro-oeste e sudeste do Brasil, devido a fatores como a alta demanda por borracha natural e ocorrência da doença mal-sul americano-das-folhas causada pelo fungo *Microcyclus ulei*, o qual é favorecido pelo clima tropical.

É uma árvore pertencente à família Euphorbiaceae e ao gênero *Hevea*, do qual são conhecidas, aproximadamente, 11 espécies, entre as quais se destaca a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. A.D. de Juss.) Müell. Arg., por apresentar maior produção de látex.

A atual produção mundial de borracha natural tem sido insuficiente para atender a demanda que vem aumentando significativamente a cada ano. Isto tem causado uma escassez de matéria prima a qual tem sido suprida, em parte, pela utilização da borracha proveniente do petróleo. Porém, em muitos casos a borracha natural é insubstituível, devido às suas características químicas e físicas (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006). Logo, a heveicultura tem se tornado uma atividade promissora especialmente no Brasil, já que o país produz apenas um terço do que é demandado.

O nitrogênio é o nutriente inorgânico requerido em maiores quantidades pelas culturas. Mineral essencial que se encontra em maiores níveis nos vegetais, participando da composição de moléculas fundamentais no metabolismo celular, sendo um elemento químico reconhecidamente imprescindível constituindo proteínas, clorofila, fitormônios etc., tornando-se, portanto, fator limitante para o crescimento vegetal nos ecossistemas terrestres. Atualmente é amplo o conhecimento sobre o metabolismo do nitrogênio em seringueira, sendo encontradas muitas informações acerca da influência da fonte nitrogenada em

diferentes concentrações no desenvolvimento dessa espécie, sabe-se dos efeitos positivos do aumento da concentração de nitrato até 8 mM sobre a acumulação de matéria seca de partes aéreas, no entanto, quando são aplicados nitrato e amônio em solução nutritiva os maiores valores de matéria seca total da parte aérea e raízes foram obtidos nas proporções de 4:4 e 0:8, ou seja, igual quantidade de nitrato de amônio ou apenas 8 mM de amônio. As enzimas glutamina sintetase, glutamato sintase, glutamato desidrogenase apresentam atividade tanto em folhas quanto em raízes de seringueira enquanto que a redutase do nitrato foi detectada apenas nas raízes. Na seiva xilemática são encontradas pequenas quantidades de nitrato, amônio e ureídeos, porém o transporte de nitrogênio ocorre preferencialmente na forma dos aminoácidos glutamina e asparagina (ALVES, 2001; COSTA NETTO, 1997; DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997a; DINIZ, 2011; LEMOS, 1996).

O estudo das formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio, bem como a avaliação das enzimas atuantes nesse metabolismo apresentam significativa importância especialmente quando se deseja avaliar comparativamente o desempenho do vegetal em diferentes condições ambientais. A situação de hipoxia, por exemplo, que ocorre causada por alagamentos periódicos em seringais na floresta Amazônica, não compromete o desenvolvimento das árvores, sugerindo que essa espécie apresenta estratégias adaptativas.

O estresse causado pela baixa disponibilidade de oxigênio em ambientes alagados tem como consequência, a alteração do metabolismo e anatomia vegetal. Plantas submetidas à hipoxia tendem a apresentar rotas metabólicas alternativas, como a via fermentativa, a produção de aminoácidos a partir do piruvato acumulado e um metabolismo antioxidante, responsável por eliminar os radicais livres de dentro das células. Raízes adventícias, lenticelas e aerênquimas são modificações anatômicas responsáveis por suprir o baixo teor

de oxigênio do meio em que se encontram as raízes. O funcionamento desses sistemas é de extrema importância indicando o nível de tolerância do vegetal a essa condição (SOUZA, 2010).

Dessa forma, o objetivo da autora com este trabalho foi avaliar a influência da baixa disponibilidade de oxigênio no substrato sobre as enzimas envolvidas na assimilação de nitrogênio e no sistema antioxidante de plantas jovens de seringueira cultivadas em nitrato e/ou amônio, além de verificar a interferência do alagamento e da fonte nitrogenada no transporte de N nítrico e amoniacal na seiva xilemática e na fotossíntese.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Seringueira

A seringueira pertence ao gênero *Hevea*, da família Euphorbiaceae, sendo sua área de ocorrência natural muito ampla, abrangendo a Amazônia brasileira, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana. O gênero compreende cerca de onze espécies, sendo elas: *H. brasiliensis*; *H. guianensis*; *H. benthamiana*; *H. nitida*; *H. rigidifolia*; *H. camporum*; *H. spruceana*; *H. microphylla*; *H. camargoana*; *H. paludosa*; *H. pauciflora*, das quais a [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss.) Muell. Arg.] é a mais importante e a única cultivada e explorada comercialmente, por apresentar maior capacidade produtiva e qualidade de látex superior às demais (SECCO, 2008).

A *Hevea brasiliensis* é uma planta de ciclo perene, de origem tropical, cultivada e utilizada de modo extrativista, com a finalidade de produção de borracha natural (CAMPELO JÚNIOR, 2000). Passou a ser cultivada em grandes monocultivos nos países asiáticos e no Brasil, seu cultivo obteve grande sucesso nas regiões sudeste, centro-oeste, na Bahia e mais recentemente no oeste do Paraná (MARINHO, 2012).

A exploração da cultura no Brasil gera benefícios, tanto socioeconômicos, gerando empregos e renda, como ambientais, representando uma alternativa à utilização de uma fonte não renovável, como o petróleo, utilizado na fabricação da borracha sintética. No entanto, a expansão da heveicultura depende do desenvolvimento de tecnologias de cultivo e de exploração apropriadas às condições edafoclimáticas das diferentes regiões, merecendo destaque aquelas acerca dos aspectos fisiológicos e metabólicos.

## 2.2 Metabolismo do nitrogênio

O conhecimento das formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio em plantas de seringueira, nas diferentes condições de ambiente, é importante na avaliação do comportamento fisiológico dessa espécie nos vários estádios de desenvolvimento do vegetal, desde a germinação até a produção de látex. O ciclo do nitrogênio é um sistema complexo de vias metabólicas reguladas que se altera em função do armazenamento, da remobilização, da reciclagem durante a fotorrespiração e da distribuição entre as vias primárias e secundárias do metabolismo (STITT et al., 2002).

O nitrogênio é encontrado no solo em duas formas: mineral e orgânica, sendo a segunda mais abundante. Aproximadamente 98% do nitrogênio no solo é orgânico e apenas 2% é mineral (MALAVOLTA, 2006).

O nitrato e o amônio são moléculas prontamente utilizáveis, sendo formadas como um resultado do processo de mineralização, realizada por microorganismos presentes no solo. O nitrato é a principal e mais abundante fonte de nitrogênio para as plantas cultivadas (CLARKE; BARLEY, 1968), uma vez que o amônio, que deriva de mineralização da matéria orgânica ou a partir de fertilizantes é gradualmente convertido a nitrato, através de um processo conhecido como nitrificação que é promovido por bactérias que oxidam o amônio livre (REDINBAUGHT; CAMPBELL, 1991). Plantas jovens de seringueira absorvem tanto nitrato quanto amônio, apresentando melhor crescimento em solução nutritiva contendo ambos os íons em iguais proporções (LE MOS, 1996).

Em solos ácidos, a forma amoniacal é mais abundante devido à inibição dos microrganismos. Após a absorção, o nitrato pode ser assimilado nas próprias raízes, nas folhas, ou ainda em ambos os órgãos, já o amônio, devido aos seus efeitos tóxicos, é principalmente assimilado nas raízes (ANTUNES et al., 2008),

no caso da seringueira observa-se a redução do nitrato a nitrito apenas nas raízes (DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1997a; LEMOS, 1996).

O elemento essencial nitrogênio é parte da estrutura química das várias substâncias envolvidas no metabolismo das plantas, tais como clorofila, fitormônios, poliaminas, algumas proteínas e enzimas, bem como moléculas envolvidas no metabolismo secundário, como alcaloides (KOZLOWSKI; PALLARDY, 1997).

O nitrogênio no solo apresenta disponibilidade reduzida apesar de ser o gás mais abundante na atmosfera. As bactérias denominadas diazotróficas, desenvolveram meios bioquímicos de reduzir  $N_2$  a amônia ( $NH_3$ ), uma molécula que pode ser absorvida pelas raízes das plantas. O processo de fixação biológica de nitrogênio apresenta grande importância, principalmente para espécies da família Fabaceae, que possuem capacidade de associação simbiótica com esses microorganismos. A interação planta-bactéria é benéfica para ambas reduzindo significativamente a necessidade de adubação nitrogenada. De acordo com Diniz (2011), existe interação entre *Hevea* e bactérias fixadoras em solos sob seringais há ocorrência de bactérias de vida livre fixadoras de nitrogênio molecular pertencentes ao gênero *Beijerinckia*. Não há indícios de bactérias endofíticas associadas à seringueira, porém plantas inoculadas apresentaram ganhos de nitrogênio que variaram entre 19 e 33%.

Entre os minerais essenciais, o nitrogênio tem um papel crucial na produção de biomassa. Em plantas superiores, a absorção de nitrato difere da absorção de outros nutrientes, uma vez que este íon induz a sua própria absorção (BRETELIER; SIEGERIST, 1984). Este processo utiliza permeases específicas localizados na plasmalema, ocorre contra o gradiente eletroquímico, e requer gasto de energia. Por outro lado, a absorção de amônio é um processo passivo, não exige energia metabólica (FERNANDES; ROSSIELLO, 1986).

A absorção de amônio pode ser considerada benéfica para algumas plantas (SANDOVAL-VILLA; ALCANTARA-GONZALES; TIRADO-TORRES, 1995). Porém, seu acúmulo pode danificar as raízes. Algumas espécies tem o crescimento da parte aérea consideravelmente reduzido se mais de 50% de nitrogênio é fornecido sob a forma amoniacal (HEBERER; BELOW, 1989), fato que não foi observado em seringueira, plantas cultivadas em nitrato e amônio em iguais proporções apresentaram crescimento superior às cultivadas em apenas nitrato (LEMOS, 1996). Haynes (1986) observou que a absorção excessiva de amônio afeta o metabolismo das plantas, aumenta as taxas de respiração, exsudação e síntese de putrescina, além de melhorar a absorção de fosfato e sulfato. Quando o nitrato é fornecido para a planta, reduz os efeitos inibitórios do amônio sobre o crescimento (OTA; YAMAMOTO, 1989). O nitrato é considerado a fonte de nitrogênio principal disponível para as plantas, mas, existem espécies que crescem melhor quando nutridas com amônio e nitrato em proporções adequadas, ao invés de somente nitrato ou amônio (MAGALHÃES; HUBER; TSAI, 1995).

A assimilação de nitrogênio varia de acordo com a proporção de  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  adicionados ao meio, uma vez que ocorreu a absorção é necessário que o nitrato seja reduzido a amônio para que a planta possa utilizar o nitrogênio, no caso de absorção de amônio esse é rapidamente incorporado a aminoácidos. O processo de redução requer energia e é mediado pelas enzimas redutase do nitrato (RN) e redutase do nitrito (NiR). Apesar da maior demanda de energia, o crescimento das plantas só ocorre em níveis ótimos quando o nitrato é fornecido, em vez de amônio (BARKER; MILL, 1980). As vantagens da utilização de nitrato, ao invés de amônio, são provavelmente, devido aos custos energéticos de desintoxicação, processo que seria necessário no caso de absorção excessiva de amônio (GUO; BRÜCK; SATTELMACHER, 2002).

Segundo Blevins (1986), a maioria das plantas lenhosas que crescem em ambientes com baixo pH e nitrificação reduzida preferem amônio à nitrato. No caso da seringueira isso pode ocorrer devido às características edáficas da sua região endêmica, que impõem que as plantas se adaptem a solos ácidos (HAAG et al., 1982). No entanto, trabalhos realizados por Lemos (1996) mostram que plantas jovens de seringueira cultivadas com nitrato e amônio em concentrações ideais apresentam melhor desempenho.

O fornecimento diferencial de nitrato e de amônio para a planta pode afetar os níveis das enzimas envolvidas no metabolismo de nitrogênio, resultando em alterações no crescimento e na produção vegetal. Com o objetivo de verificar a contribuição quantitativa de cada enzima de assimilação durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas muitas pesquisas estão sendo realizadas, mas a existência de isoenzimas, distribuídas em diferentes órgãos e compartimentos celulares gera resultados divergentes.

A absorção de nitrato pelas raízes ocorre através de transportadores específicos localizados na superfície da célula. É um processo chamado de simporte, em que os íons de  $H^+$  são co-transportados. Posteriormente o íon é reduzido a nitrito pela enzima redutase do nitrato, nas próprias raízes ou transportado para a parte aérea, via xilema, para ser reduzido nas folhas. O nitrito originado da redução do nitrato no citosol é transportado para o interior dos cloroplastos nas folhas e dos plastídeos nas raízes. Nestes compartimentos, ocorre a redução do nitrito a amônio pela ação da redutase do nitrito e assimilação do nitrogênio amoniacal em aminoácidos (CAMPBELL, 2001).

A redutase do nitrato (RN) é considerada enzima chave na regulação do metabolismo do N, já que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a  $NH_4^+$  antes de ser incorporado em compostos orgânicos no sistema radicular e/ou na parte aérea. Devido ao seu papel regulador da disponibilidade de N reduzido para o metabolismo das plantas, a atividade da RN está relacionada

com a produtividade dos vegetais e sua capacidade em responder à adubação nitrogenada (BEEVERS; HAGEMAN, 1969).

A RN possui três isoformas, duas delas são constitutivas e apresentam atividade ótima em pH 6,5. A primeira é NAD (P) H-dependente e localizada em tecidos aclorofilados, a segunda é dependente de NADH e está presente em tecidos fotossintéticos. A terceira isoforma precisa ser induzida, é dependente de NADH e possui uma atividade ótima a pH 7,5 (SOLOMONSON; BARBER, 1990). Sua regulação é realizada a nível transcricional e pós-traducional, sendo o segundo mais relevante (LEA et al., 2006). A luz é considerada o fator, mais eficaz na regulação (MEYER; STITT, 2001), porém a transcrição é influenciada também por nitrato, luz, fitormônios e fotoassimilados (APPENROTH et al., 2000; LEHABA et al., 2001), enquanto a nível pós-traducional a regulação é afetada por fosforilação, desfosforilação, luz, oxigênio e disponibilidade de dióxido de carbono (KAISER; HUBER, 1994).

Usando técnicas *in vivo* e *in vitro* Alves (2001), Costa Netto (1997), Delú Filho, Oliveira e Alves (1997a), Lemos (1996) e Shan (2007), verificaram a atividade da RN em raízes de seringueira, e Shan (2007) também detectou a atividade desta enzima no caule de plântulas de seringueira, porém até o momento não há relatos da atividade da RN em tecidos foliares. A ausência de atividade da RN nas folhas dessa espécie pode significar uma vantagem adaptativa já que a seringueira é semidecídua.

Em seringueira a atividade RN é estimulada por níveis crescentes de  $\text{NO}_3^-$ , até a concentração de 12 mM (DELÚ FILHO et al., 1998). Lemos et al. (1999) utilizaram  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em diferentes proporções, e observaram que a atividade RN foi maior quando só foi fornecido o nitrato e diminuiu à medida que o amônio foi adicionado. Alves (2001) sugere que RN é uma enzima pré-existente nas raízes, como uma consequência da mobilização do nitrato presente

em sementes, pois observou a atividade da RN em mudas de seringueira cultivadas apenas com água.

A sintetase da glutamina (GS) catalisa a reação do amônio e glutamato produzindo glutamina e a enzima sintase do glutamato (GOGAT) é responsável pela reação da glutamina com o 2 – oxoglutarato, gerando duas moléculas de glutamato. O amônio pode ser assimilado também por intermédio de uma rota alternativa, conhecida como rota da glutamato desidrogenase (GDH) a qual catalisa a reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato, prevalecendo a formação de amônio e 2-oxoglutarato.

A via GS / GOGAT é a principal via de assimilação primária de amônio em plantas superiores (MIFLIN; LEA, 1976), superando, portanto, a reação catalisada pela enzima GDH. O amônio presente nos tecidos vegetais pode derivar de absorção direta, redução de nitrato, desaminação de compostos nitrogenados, ciclo fotorrespiratório (KANT et al., 2007) ou da fixação biológica.

A GS apresenta uma afinidade elevada para o amônio, ela catalisa a formação de glutamina a partir de glutamato e amônio em uma reação que necessita de ATP e de um cátion bivalente ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Co^{2+}$ ) como cofator. Em plantas suas isoformas estão localizadas no citosol e nos plastídios. As isoformas citosólicas são expressas durante a germinação das sementes ou nos feixes vasculares de raízes e parte aérea. A GS presente nos plastídios localizados nas raízes gera amida que pode ser usada nesse mesmo órgão ou transportada via xilema para a parte aérea, enquanto que a GS dos cloroplastos localizados em partes aéreas reassimilam o  $NH_4^+$  gerado pela fotorrespiração (LAM et al., 1996).

A conversão de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato é catalisada pela GOGAT. Nos vegetais são encontradas duas isoformas desta enzima, NADH-GOGAT presente em tecidos aclorofilados e a

ferredoxina-GOGAT que é uma proteína monomérica localizada nos cloroplastos e aumenta a sua atividade durante o desenvolvimento de folhas expostas à luz. Existe também uma relação dessa proteína com o metabolismo respiratório, ou seja, fornecendo glutamato, para o ciclo dos ácidos tricarbônicos. O sistema de GS / GOGAT atua eficientemente na catálise de assimilação de amônio.

A GDH catalisa a via alternativa de assimilação de amônio. Existem duas isoformas: GDH dependente de NADH encontrada nas mitocôndrias, enquanto que os cloroplastos apresentam uma NADPH dependente. A atividade da GDH é maior no sentido de liberação de amônio a partir do glutamato.

O nitrogênio absorvido pode ser translocado das raízes para as partes aéreas da planta através do xilema em duas formas: mineral ( $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) e orgânico. As formas orgânicas resultam da assimilação de amônio, que gera aminoácidos para atender a demanda de outros órgãos da planta. Uma vez nos órgãos alvos, outros aminoácidos são produzidos por reações de transaminação. Em algumas espécies de plantas, quando nitrogênio é fornecido como nitrato, este íon é translocado para as partes aéreas e reduzido a amônio, que é posteriormente incorporado aminoácidos (SCHMIDT; STEWART, 1998). A translocação depende da concentração externa do íon, da idade da planta, e da etapa de desenvolvimento. Alves (2001) avaliou o transporte de nitrato em mudas de seringueira e relataram os mais altos níveis deste íon na seiva 24 e 144 horas após a adição da solução nutritiva. O autor também observou a ausência de amônio na seiva do xilema. Como não há atividade da RN em folhas de seringueira, a presença de  $\text{NO}_3^-$  na seiva pode ser explicada pela atividade enzimática no caule da planta (SHAN, 2007). Em adição ao nitrato, alguns compostos nitrogenados, tais como os aminoácidos são também translocado através do xilema. Os fatores ambientais tais como intensidade de luz e

temperatura, podem influenciar o tipo de composto nitrogenado predominante na seiva do xilema.

Alves (2001) observou em seringueira que em plantas de 1 ano de idade, a principal forma de nitrogênio translocados foi glutamina, seguido pelo glutamato e aspartato, enquanto que em plantas com seis meses de idade arginina foi a forma predominante na seiva do xilema, seguido de glutamina, glutamato, asparagina e aspartato. Já Diniz (2011), relatou que as formas nitrogenadas translocadas na seiva do xilema de plantas jovens de seringueira são, preferencialmente, aminoácidos, nitrato, ureídeos e amônio, nessa ordem. Sendo que os principais aminoácidos transportados na seiva do xilema das mudas de seringueira cultivadas com 8 mM de N são glutamina, GABA, aspartato, arginina, glutamato, alanina e serina. A mesma autora ainda afirma que em plantas de seringueira inoculadas com bactérias diazotróficas ocorre um aumento do GABA, aspartato, glutamato e alanina, e diminuição no conteúdo de glutamina e arginina na seiva do xilema.

Na figura 1 está representado um esquema resumido do processo de assimilação das diferentes formas de aquisição do nitrogênio em plantas.

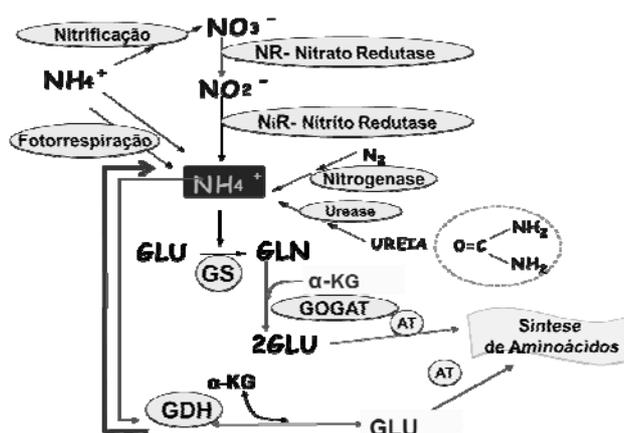


Figura 1 Reações de assimilação das diferentes formas de aquisição do nitrogênio

### **2.3 Alterações metabólicas e anatômicas de plantas sob hipoxia**

O oxigênio também é um elemento imprescindível para o correto desenvolvimento vegetal, representa aproximadamente 20% da composição da atmosfera terrestre e participa de maneira relevante no ciclo energético dos seres vivos, sendo essencial na respiração celular dos organismos aeróbicos. Na fosforilação oxidativa os elétrons removidos da glicose são transportados ao longo de uma cadeia transportadora, criando um gradiente protônico que permite a fosforilação do ADP. O aceptor final de elétrons é o O<sub>2</sub>, que, depois de se combinar com os elétrons e o hidrogênio, forma água.

A deficiência de O<sub>2</sub> está associada a uma série de modificações no metabolismo e no crescimento vegetal, afetando a produtividade de espécies importantes economicamente.

O alagamento do substrato vegetal proporciona uma condição de anoxia ou hipoxia, dependendo da disponibilidade de oxigênio. Os vegetais apresentam diferentes respostas ao excesso de água, podendo tolerar desde horas até dias de estresse (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). Nessas condições, não há manutenção do metabolismo aeróbico e produção de energia suficiente para que a planta cresça adequadamente. A baixa taxa de difusão de oxigênio leva a planta, especialmente as raízes, a uma aclimação bioquímica anaeróbica, buscando manter taxas de metabolismo basal para sustentar sua sobrevivência sob economia de energia (IRFAN et al., 2010).

Ao sofrer alagamento, as plantas produzem sinais metabólicos de vários tipos, em resposta à diminuição dos níveis endógenos de oxigênio. Nesse período elas alteram sua arquitetura, anatomia, metabolismo e crescimento como estratégia de sobrevivência (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). Alterações metabólicas de plantas sob hipoxia são o fechamento estomático,

com redução na captação de CO<sub>2</sub>; menor fotossíntese; menor absorção de nutrientes e translocação de carboidratos.

A sinalização do estresse pode ocorrer de duas maneiras: pela diminuição da concentração de oxigênio e por um aumento de etileno. As respostas das plantas pela sinalização do etileno estão bem definidas, já os resultados obtidos sobre a sinalização de oxigênio ainda não são bem claros (VISSER; VOESENEK, 2004). Como consequência da queda nos níveis de oxigênio, há uma regulação negativa do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs) que é o principal mecanismo gerador de esqueletos de carbono.

Com a baixa disponibilidade de oxigênio, a planta inicia a rota fermentativa, com diminuição na produção de ATP e poder redutor. Ocorre a expressão de proteínas específicas de estresse anaeróbico, os chamados polipeptídeos anaeróbios (ANP) (KOZLOWSKI, 1984; LIAO; LIN, 2001). As proteínas anaeróbicas são, em sua maioria, relacionadas à glicólise e ao metabolismo de açúcares-fosfato, tais como aldolases, piruvato descarboxilase, enolases, glicose-6-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sacarose sintase e álcool desidrogenase (SUBBAIAH; SACHS, 2003).

A hipoxia promove o acúmulo de lactato que leva a acidose citosólica, evento que inibe a produção das aquaporinas, um dos subgrupos dentro da classe das “Intrinsic Membrane Proteins – IMPs” responsável pelo transporte de água através de membranas. Essas proteínas, supostamente, seriam responsáveis por mediar a inibição do transporte de água através das raízes (TOURNAIRE-ROUX et al., 2003).

Um sistema deficiente de absorção de água leva ao fechamento estomático, logo a fixação de CO<sub>2</sub> torna-se limitada, diminuindo a redução do carbono pelo ciclo de Calvin e, conseqüentemente, o NADP<sup>+</sup> oxidado, que serve como aceptor de elétrons da fotossíntese. Durante a transferência de elétrons, quando a ferredoxina se encontra super-reduzida, elétrons podem ser

transferidos do fotossistema I (PS I) para o oxigênio, formando o radical superóxido ( $O_2^-$ ), por um processo conhecido como reação de Mehler. Esse processo provoca reações em cadeia, gerando mais espécies reativas de oxigênio (EROs), causando o chamado estresse oxidativo (BEN AHMED et al., 2009; PANDA; KHAN, 2009).

As EROs como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singleto são geradas durante processos metabólicos nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, sendo seu acúmulo potencialmente prejudicial às células da planta, provocando danos em biomoléculas valiosas como o DNA, RNA, proteínas e membranas celulares (JALEEL et al., 2009).

Os radicais  $O_2^-$  e  $OH^-$  possuem baixa mobilidade pela membrana celular e curto tempo de meia-vida, o que implica em elevada capacidade de reação e especificidade de sinalização dessas EROs.

O peróxido de hidrogênio uma espécie não radical, possui capacidade de cruzar as membranas celulares e maior tempo de meia-vida, o que possibilita agir como molécula sinalizadora do estresse oxidativo (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). Os radicais  $OH^-$ , que podem ser formados a partir de  $O_2^-$  ou  $H_2O_2$  na reação de Haber-Weiss, são os mais reativos, sendo também considerados os iniciadores da peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993).

A formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pela alteração do metabolismo mitocondrial e pelos polipeptídeos anaeróbicos é conhecida também. O óxido nítrico (NO) pode ser considerado uma molécula de sinalização do estresse, já que possui propriedades químicas favoráveis para penetrar a bicamada lipídica, sendo transportado na célula. O NO é produzido, em virtude da continuidade do estresse, pelas rotas enzimáticas ou não enzimáticas, possui curto tempo de meia-vida e pode ser facilmente removido da célula. Esse composto pode reagir facilmente com o oxigênio, formando

produtos tóxicos à célula e que participam também das rotas de sinalização de estresse. Os produtos da reação de NO com oxigênio, como o nitrito, pode ser metabolizado pela redutase do nitrito de membrana, que o converterá a NO. Também mitocôndrias sob severa anoxia reduzem o  $\text{NO}_2^-$  a NO (STOHR; STREMLAU, 2006).

É bem conhecido que a adição exógena de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) aumenta a tolerância das plantas à baixa disponibilidade de  $\text{O}_2$ , mas os mecanismos pelos quais o  $\text{NO}_3^-$  exerce esse efeito não estão esclarecidos. Recentemente, o nitrito gerado através da redução do  $\text{NO}_3^-$  tem emergido como uma molécula sinalizadora e como um substrato para a síntese do óxido nítrico (NO), um radical cujo papel durante a hipoxia tem sido sugerido. A produção de NO em raízes em hipoxia na presença de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  ainda, não é clara. Resultados de estudos nessa área contribuirão para um melhor entendimento da resposta metabólica e da adaptação de plantas à deficiência de  $\text{O}_2$ , o que se torna essencial diante das atuais mudanças climáticas e do aumento das situações de alagamento no planeta (ROCHA et al., 2010).

Como uma estratégia de proteção aos danos oxidativos, as plantas têm desenvolvido um complexo sistema de defesa não enzimático, composto por carotenóides, ascorbato, glutatona,  $\alpha$ -tocoferóis; e enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1)), que catalisa a reação do radical superóxido à  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; catalase (CAT; EC 1.11.1.6) que produz água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; e enzimas do ciclo ascorbato-glutatona, como a ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) que detoxifica o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pela SOD (BEN AHMED et al., 2009; JALEEL et al., 2009; MANIVANNAN et al., 2008).

A SOD catalisa a dismutação dos íons superóxido, formando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . É a primeira enzima do sistema antioxidante e pode ser vista como protetora contra os danos oxidativos causados pelos radicais  $\text{O}_2^-$  (SCANDALIOS, 1993), pois

está presente em todos os compartimentos celulares suscetíveis ao estresse oxidativo (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). A CAT transforma o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular. Está presente predominantemente nos peroxissomos (FRUGOLI et al., 1996) podendo ser encontrada em outros compartimentos celulares. A APX está presente em cloroplastos e mitocôndrias, ou ainda no citosol e nos peroxissomos, apresentando alta afinidade pelo substrato (WILLEKENS et al., 1995) é a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, que tem como substrato  $H_2O_2$ , formando água como produto final. O ascorbato é utilizado como cofator enzimático, resultando na formação de dehidroascorbato o qual é reciclado a ascorbato, sendo a glutatona reduzida (GSH) a doadora de elétrons, de forma que a glutatona oxidada (GSSG) seja convertida pela glutatona redutase (GR) dependente de NADPH (ASADA; TAKAHASHI, 1987).

A ação combinada dessas três enzimas permite a conversão de radicais  $O_2^-$  e de  $H_2O_2$ , prejudiciais à célula, em água e oxigênio molecular ( $O_2$ ). A eficiência do sistema antioxidante em resposta ao estresse é de extrema importância para a sobrevivência das plantas ao alagamento do substrato.

Quando os organismos aeróbicos são privados de  $O_2$ , a fosforilação oxidativa mitocondrial é inibida, enquanto que as vias glicolíticas e fermentativas são promovidas, levando à acumulação de produtos de diversos tipos como lactato, etanol, Alanina, GABA, succinato e malato (FAN et al., 1997; FAN; HIGASHI; LANE, 1988).

Os principais produtos da fermentação em tecidos de plantas são o lactato, etanol e Alanina, todos os três derivados de piruvato, o produto final da glicólise (DREW, 1997; RICARD et al., 1994). O acúmulo de piruvato é resultado do declínio na taxa de oxidação e aumento da taxa de síntese, através de descarboxilação do ácido oxalacético (STREETER; THOMPSON, 1972).

Uma parte deste aumento em piruvato também tem sido atribuída à indução da enzima málica, em raízes sob hipoxia (ROBERTS et al., 1992).

O succinato é outro metabólito que se destaca durante hipoxia sua produção resulta da parcial operação do ciclo de TCA, na direção inversa fornecendo 2-oxoglutarato para o metabolismo do nitrogênio sob deficiência de  $O_2$ . A produção de succinato também pode conferir tolerância a hipoxia, através da produção de ATP, embora limitada, dentro da mitocôndria (MENEGUS et al., 1989).

Em estudo com espécies arbóreas tropicais adaptadas à encharcamento do solo, observou-se que durante os estágios iniciais de estresse hipóxico as raízes não produzem grandes quantidades de etanol e lactato, transformando piruvato em malato. Roberts et al. (1992) defendem ainda que o malato seria transformado novamente em piruvato que por sua vez iria sofrer transaminação para formar Alanina.

O GABA é um aminoácido que se acumula em várias condições de estresse, incluindo deficiência  $O_2$ . A sua síntese ocorre principalmente pela- $\alpha$  descarboxilação do Glutamato (CRAWFORD et al., 1994). O aumento na produção de GABA pode ser explicado pelo reduzido pH citoplasmático de células em hipoxia. A interconversão de aminoácidos ajuda regulação do pH celular em órgãos das plantas sob deficiência  $O_2$  (FAN; HIGASHI; LANE, 1988) uma característica considerada fundamental para a sobrevivência das espécies sob hipoxia (RICARD et al., 1994).

A tolerância das plantas a baixa disponibilidade de oxigênio no meio varia entre as espécies, genótipos da mesma espécie e idade das plantas, tempo de submersão e também está relacionada diretamente à eficiência e atividade catalítica das enzimas envolvidas no metabolismo do carbono, do nitrogênio e antioxidativo (CRAWFORD, 1978).

Adaptações morfológicas e anatômicas como raízes adventícias, lenticelas, aerênquimas, epinastia, murchamento, abscisão foliar e modificações no número, tamanho e localização dos estômatos também podem ser observadas em plantas em condições de alagamento.

O desenvolvimento de estruturas morfo-anatômicas está relacionado com aumento da concentração do etileno, devido à submersão da planta ou parte dela. Entretanto, o aumento da concentração de etileno em plantas submetidas a outras condições adversas como déficit hídrico e altas temperaturas não ocasiona a formação das estruturas citadas acima indicando que existem outros produtos que sob hipoxia interagem com o etileno induzindo a formação destas estruturas de adaptação (KOZLOWSKI, 1984).

Os aerênquimas são uma especialização do tecido parenquimático, caracterizados por espaços intercelulares que mantêm o sistema de aeração da planta, sendo característicos de plantas de ambientes alagados, pois permitem maior tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio. Os aerênquimas podem ser constitutivos (determinação genética) ou induzidos por estímulos ambientais (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). O etileno é o principal estímulo para a formação de aerênquimas por meio de morte celular programada.

A formação de aerênquimas para oxigenação de partes submersas é importante para que o oxigênio possa ser transportado da parte aérea para as raízes. Aerênquimas podem ser formados pelo afastamento das células do córtex do caule ou raízes (origem esquiosogênica) ou pela lise de algumas células (origem lisogênica). Lenticelas também são modificações em plantas submetidas à inundação, pode ocorrer na porção do caule próxima a lâmina de água facilitando a difusão dos gases para o interior do córtex. Além de ajudar na entrada de oxigênio as lenticelas podem servir como elementos importantes na liberação de produtos fitotóxicos produzidos sob baixa disponibilidade de oxigênio, tais como etanol e acetaldeído. Os estômatos também são estruturas

fundamentais para a sobrevivência das plantas, pois são responsáveis pelas trocas gasosas, qualquer variação no número, ou tamanho destes acarreta uma maior ou menor eficiência da planta seja quanto a taxa fotossintética ou no uso da água (KAWASE, 1981).

Em seringueira características como epinastia, abscisão e murchamento foliar são claramente observadas em plantas com inundação do sistema radicular, a partir do oitavo dia de indução da hipoxia. A partir do sexto dia ocorreu também o aparecimento de lenticelas hipertrofiadas (BOTELHO et al., 1998).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido em casas de vegetação do setor de fisiologia vegetal, Departamento de biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, localizada a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'W GRW.

As sementes de seringueira foram oriundas de um plantio policlonal localizado em Votuporanga - São Paulo, coletadas em fevereiro de 2011 e mantidas armazenadas por 1 mês em sacos de papel revestidos com sacola plástica colocados em armário a temperatura ambiente, de acordo com recomendações de Bonome (2006). As sementes de seringueira foram selecionadas quanto à uniformidade, cor e tamanho e desinfestadas superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e após esse período foram lavadas com água a fim de retirar o hipoclorito de sódio. Em seguida foram destegumentadas e as amêndoas foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada em água corrente e desinfestada com hipoclorito de sódio 0.5%. Lavou-se novamente a areia com água de torneira e posteriormente com água destilada. Ao atingirem o estágio palito as plântulas foram retiradas das bandejas, selecionadas quanto à uniformidade e transferidas para vasos contendo três litros de areia nas mesmas condições descritas acima. Foram cultivadas duas plantas por vaso, as quais foram mantidas apenas com água destilada até indução dos tratamentos. Trinta dias após o transplante iniciaram-se os tratamentos que consistiram da aplicação da solução nutritiva de Bolle-Jones (1957), modificada por Lemos (1996), conforme tabela 1, com nitrogênio na concentração de 8 mM, na forma de nitrato e/ ou amônio nas seguintes proporções: 8/0; 4/4; 0/8 e 0/0. Em cada vaso foram adicionados 1.000 mL da solução nutritiva havendo um excesso de 150 mL, o qual era coletado em pratos plásticos colocados sob os vasos, ou seja, 850 mL

ficavam retidos na areia. Diariamente a solução contida nos pratos era completada com água destilada, ajustada em pH 6,5, quando necessário e retornada para o vaso. Semanalmente as soluções eram renovadas. Esse procedimento foi realizado até que as plantas atingissem 12 meses.

Então, as plantas foram transferidas de uma casa de vegetação comum, ou seja, totalmente fechada com plásticos para outra casa de vegetação coberta, porém que possuía sombrites nas laterais. Cada vaso continha duas plantas e cada tratamento era composto por doze repetições sendo utilizadas quatro repetições em cada dia avaliado (7, 14 e 21 dias após indução do alagamento). Nesse momento separadas em 8 tratamentos, sendo que as proporções de nitrato e amônio (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) ocorriam tanto em condições de normoxia (controle) quanto em hipoxia (alagamento). Para o alagamento foram utilizadas soluções nutritivas diluídas, mantendo, porém as quantidades de nitrogênio, os vasos nos quais as plantas estavam sendo cultivadas foram colocados dentro de outro vaso maior para simulação do alagamento. Os procedimentos para completar as soluções, aferir o pH ou qualquer outra manipulação foram realizados sempre de modo que não houvesse movimento da solução de alagamento para que não ocorresse aeração do meio.

Foram realizadas três coletas de material vegetal, aos sete, quatorze e vinte e um dias, após indução do alagamento, para análises das atividades enzimas do metabolismo do nitrogênio (RN, GS, GOGAT, GDH) e do metabolismo antioxidante (SOD, CAT, APX). Nas mesmas datas procedeu-se a coleta do exsudato do xilema e avaliou-se a fotossíntese. Sempre no dia anterior às coletas as soluções nutritivas eram renovadas.

Tabela 1 Composição da solução nutritiva em função dos diferentes tratamentos utilizados no experimento. UFLA, Lavras, MG

Sal	Solução estoque (SE)	Proporção de nitrato e amônio (mM)			
		0/0	8/0	0/8	4/4
		Volume da SE			
Macronutrientes	(M)	mL.L <sup>-1</sup>			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,5	-	6,0	-	
KNO <sub>3</sub>	0,5	-	4,0	-	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	-	-	6,0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	-	-	2,0	
CaSO <sub>4</sub>	0,01	150	-	150	100
KCl	0,5	2,0	-	4,0	2,5
MgSO <sub>4</sub>	0,5	2,5	5,0	2,0	2,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	2,0	2,0	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	2,0	1,0	1,0	3,0
CaCl <sub>2</sub>	0,5	-	-	-	1,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	-	-	1,0	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5				80
Micronutrientes	mmol.L <sup>-1</sup>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25	1,0	1,0	1,0	1,0
CuSO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Fé-EDTA	20	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
MnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0
ZnSO <sub>4</sub>	2	1,0	1,0	1,0	1,0
Elemento		Concentração total (mg.L <sup>-1</sup> )			
N		0	112	112	112
P		31	31	31	31
K		117	117	117	117
Ca		60	120	60	60
Mg		30	60	24	30
S		120	96	198	120

### 3.1 Avaliação de altura, diâmetro e fotossíntese

Antes das plantas serem submetidas ao alagamento foram efetuadas medições da altura e diâmetro do caule das plantas de cada tratamento no décimo segundo mês de desenvolvimento, a altura foi medida do colo ao meristema apical. O diâmetro do caule foi avaliado a uma distância de 7 cm da superfície do substrato de cultivo.

A fotossíntese foi avaliada aos sete, quatorze e vinte e um dias após indução do alagamento, entre 9 h e 10 h horas da manhã, no folíolo central do terceiro lançamento foliar. Utilizou-se o analisador de gás infravermelho IRGA (Infrared Gas Analyzer, LI6400, Licor), para avaliação da taxa assimilatória líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );

### 3.2 Atividade *in vivo* da redutase do nitrato (RN; E.C.1.6.6.1)

Para as análises da atividade da RN empregou-se o método *in vivo*.

Devido a problemas metodológicos as plantas utilizadas para quantificação da atividade desta enzima não foram as mesmas utilizadas para as todas as outras avaliações, apenas nessa análise foram utilizadas plantas cultivadas nas mesmas condições já mencionadas, porém elas apresentavam seis meses de idade.

As raízes foram lavadas com água destilada em seguida foram fragmentadas em pequenos segmentos (500 mg de raízes). Esses materiais foram colocados em becker, onde se adicionaram 5 ml de uma solução de incubação. Esta foi constituída por tampão fosfato 0,1 M, contendo n-propanol e KNO<sub>3</sub>.

O tecido vegetal, submerso nessa solução, foi infiltrado a vácuo por duas vezes. Após esse procedimento, os beckers foram mantidos na ausência de luz, em banho-maria a 30 °C com agitação.

Para determinar a quantidade de nitrito formada pela reação, a cada alíquota de 0,5 mL retirada do meio de incubação foi adicionada 1 mL de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N e 1 mL de N-naftil-etileno-diamino a 0,02%, completando-se o volume final para 4 mL com água destilada. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Kg MF}^{-1}$ .

### **3.3 Obtenção dos extratos enzimáticos e avaliação da atividade da Sintetase da Glutamina (GS; E.C.6.3.1.2), glutamato sintase (GOGAT; E.C.1.4.1.7) e glutamato desidrogenase (GDH; E.C.1.4.1.3)**

As atividades dessas enzimas foram avaliadas segundo protocolos de rotina do laboratório de nutrição e metabolismo de plantas da Ufla.

A obtenção dos extratos e o ensaio enzimático da sintetase da glutamina (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH) foram realizados da seguinte forma: o material vegetal utilizado era composto de 1 grama de raízes laterais ou lâminas foliares previamente lavadas em água destilada, coletadas após 24 horas de aplicação de solução nutritiva e 5 horas de exposição das plantas à luz, sendo imediatamente colocadas em papel alumínio e congeladas em N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, o material foi transferido para freezer, onde permaneceu armazenado até a execução das análises.

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela maceração de 1,0 grama de tecido em graal com N<sub>2</sub> líquido, em 5 mL de um meio composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5, 10% de polivilpolipirrolidona (PVPP), ditioneitol (DTT) 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM e ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,1 M. Após centrifugação a 13000 g por 20' a 4 °C, o sobrenadante foi acondicionado em eppendorfs e mantidos sob refrigeração.

O ensaio da GS foi realizado tomando-se uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de um meio reacional contendo 200  $\mu\text{L}$  de tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; 100  $\mu\text{L}$  de mercaptoetanol 0,1 M; 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 M; 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_2\text{OHCl}$  0,1 M; 100  $\mu\text{L}$  de glutamato monossódico 0,5 M e 100  $\mu\text{L}$  de ATP 0,1 M. Incubou-se a mistura a 30 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de uma solução composta de  $\text{FeCl}_3$  0,37 M, HCl 0,67 M e ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M. Em seguida centrifugou-se a 16000 G por 5 minutos e o quelato Fe-L-glutamil- $\gamma$ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{mol}$  de GHA.  $\text{g}^{-1}\text{MF}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A atividade da NADH-GOGAT foi determinada adicionando-se 20  $\mu\text{L}$ , do extrato bruto obtido das raízes a 180  $\mu\text{L}$  de um meio constituído de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, GLN 15 mM, 2-oxoglutarato 15 mM, KCl 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM, e NADH 0,20 mM. Pelo decréscimo na concentração do NADH avaliado a 340 nm, determinou-se a atividade enzimática. O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $6,22 \text{ mmol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

O ensaio da desidrogenase do glutamato (GDH) foi realizado tomando-se um volume de 20  $\mu\text{L}$  do extrato bruto a esse volume foi adicionado 180  $\mu\text{L}$  meio constituído de tampão tris-HCl 100 mM, pH 7,8,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  100 mM, 2-oxoglutarato 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  4 mM e NADH 20 mM. O monitoramento da oxidação do NADH foi realizado em 340 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $6,22 \text{ mmol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **3.4 Coleta da seiva do xilema**

O exsudato de xilema foi obtido por meio da metodologia adaptada de Diniz (2011), Milburn e Ranasinghe (1996), Scholander et al. (1964) e Stoermer et al. (1997). As plantas foram cortadas a 8 cm do coleto. As raízes foram então

lavadas em água destilada para retirada do excesso de areia. Procedeu-se, então, a retirada da casca do caule. Esse material foi transferido para uma Bomba de Pressão do tipo “Scholander” deixando a extremidade cortada do caule acima da câmara. Efetuou-se um novo corte na extremidade do caule utilizando-se de uma lâmina estéril, sendo o caule lavado em água destilada em toda a sua extensão. Foi aplicada uma pressão entre 0,3 e 0,5 bar, favorecendo o início da coleta (STOERMER et al., 1997). Uma seringa descartável foi posicionada na região central do xilema, foi então realizada uma sucção à medida que a seiva exsudava na superfície do corte do caule. Desta forma, os exsudatos foram transferidos para eppendorfs gelados com a base imersa em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer para a realização das análises.

### **3.5 Quantificação de Nitrato na seiva do xilema**

A determinação de nitrato foi executada conforme o método de (CATALDO et al., 1975). Nos tubos de ensaio foram pipetados 100  $\mu$ L da amostra e 400  $\mu$ L do reagente salicílico (ácido salicílico 5% p/v em  $H_2SO_4$  concentrado) agitando-se cada tubo. Decorridos 20 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados lentamente 9,5 mL de NaOH 2N. Após resfriamento à temperatura ambiente, os tubos foram agitados novamente e medidas as absorvâncias a 410 nm.

### **3.6 Quantificação de Amônio na seiva do xilema**

A determinação de amônio seguiu a metodologia estabelecida por (MCCULLOUGH, 1967). Foram utilizados 100  $\mu$ L da amostra, adicionaram-se 500  $\mu$ L do reagente I e 500  $\mu$ L do reagente II, perfazendo ao todo 1,1 mL.

Reagente I: Fenol 0,1 M + SNP (nitroprussiato de sódio) 170  $\mu$ M. Reagente II: NaOH 0,125 M + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O 0,15 M + NaOCl (3% Cl<sub>2</sub>). Após a adição do reagente I, agitou-se para depois acrescentar o reagente II, em seguida os tubos foram transferidos para banho-maria a 37 °C, por 35 minutos. Esperou-se até que os mesmos atingissem a temperatura ambiente. As leituras foram realizadas a 625 nm.

### **3.7 Obtenção dos extratos enzimáticos e avaliação da atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e superóxido dismutase (SOD; 1.15.1.1)**

As atividades dessas enzimas foram avaliadas segundo protocolos de rotina do laboratório de bioquímica e fisiologia molecular de plantas da Ufla.

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,3 g de lâminas foliares, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 375  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), 15  $\mu$ L de EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM, 22 mg de PVPP e 1035  $\mu$ L de água. O extrato foi centrifugado a 13000 g por 10 minutos a 4 °C e sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT et al., 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Foram adicionados 100  $\mu$ L do extrato enzimático a 1,9 mL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10  $\mu$ M, NBT 1mM, riboflavina 0,2 mM e água. Os tubos contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras

foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição =  $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$ . Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 1950  $\mu\text{L}$  do meio de incubação contendo 1000  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 200 mM e 850  $\mu\text{L}$  de água incubado a 28 °C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 1950  $\mu\text{L}$  do meio de incubação composto por 1000  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 100  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM, 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2 mM e 700  $\mu\text{L}$  de água (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.8 Avaliação Anatômica das raízes**

A avaliação anatômica foi realizada no laboratório de anatomia vegetal do departamento de biologia da Ufla, as raízes das plantas de seringueira foram coletas aos sete, quatorze e vinte e um dias apos indução do alagamento. As raízes secundárias foram lavadas em água destiladas e em seguida fixadas em FAA (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) por 72 horas e posteriormente armazenadas em etanol 70% (KRAUS; ARDIUM, 1997).

Os cortes transversais foram realizados no terceiro centímetro da zona pilífera da raiz secundária, em micrótomo de mesa. As secções transversais foram clarificadas em hipoclorito de sódio 5% por 9 minutos, lavadas duas vezes em água destilada e depois colocadas por 7 minutos em água destilada novamente e posteriormente coradas com safrablau (safranina 7,5 : azul de Astra 2,5). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina 50% (KRAUS; ARDIUM, 1997). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX-60 acoplado a uma câmara digital Canon Poxer Shot A 620.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Altura e diâmetro

O crescimento em altura das plantas não diferiu em função da fonte nitrogenada. As plantas cultivadas com nitrato apresentaram maior crescimento em diâmetro. As plantas cultivadas na ausência de nitrogênio mostraram um crescimento de aproximadamente 60% das cultivadas com nitrogênio. Esse expressivo desenvolvimento de plantas que nunca receberam nitrogênio se deve possivelmente a mobilização das reservas das sementes e a associação dessas plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio (DELÚ FILHO; OLIVEIRA; VALE, 1997b; DINIZ, 2011).

Avaliando os efeitos de diferentes concentrações de nitrato (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 mM) em mudas de seringueira, Delú Filho, Oliveira e Vale (1997b) relatam os efeitos positivos do aumento da concentração de até 8 mM sobre o crescimento das partes aéreas, enquanto que a concentração de 16 mM causou uma diminuição dessa característica.

Já, Lemos et al. (1999) observaram que os maiores valores de matéria seca total da parte aérea e raízes foram obtidos nas proporções de 4:4 e 0:08, ou seja, igual quantidade de nitrato de amônio ou apenas amônio. Os autores também relataram aumento gradual do valor de área foliar com o aumento dos níveis de amônio até a proporção de 4:4.

Diniz (2011), trabalhando com plantas jovens de seringueira tratadas com 8 mM de nitrogênio encontrou valores semelhantes a esses para as características de altura e diâmetro.

De acordo com Gonçalves e Rossetti (1982), o crescimento da planta reflete diretamente em seu bom desenvolvimento, e tanto a altura quanto o diâmetro do caule são componentes associados à produtividade em *Hevea*,

Gonçalves et al. (1984) verificaram que há correlação entre produção e altura da planta, e produção e diâmetro do caule.

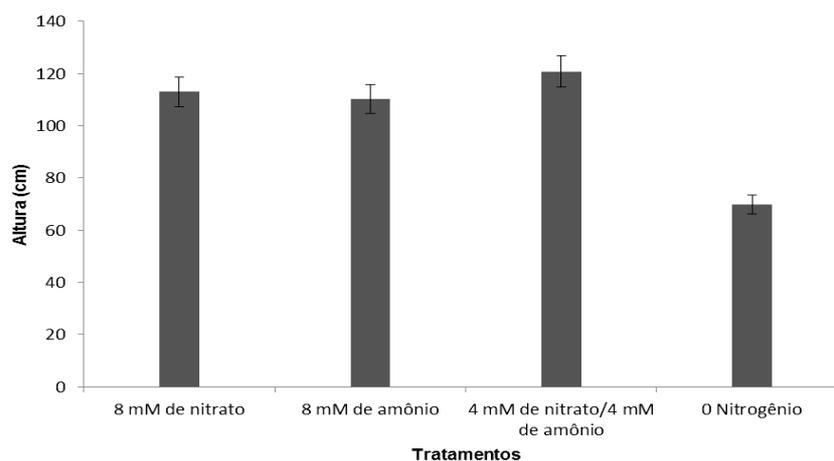


Figura 2 Altura de plantas de seringueira avaliada aos 12 meses de idade em função da fonte e concentração de nitrogênio. As barras correspondem ao erro padrão da média de 8 repetições

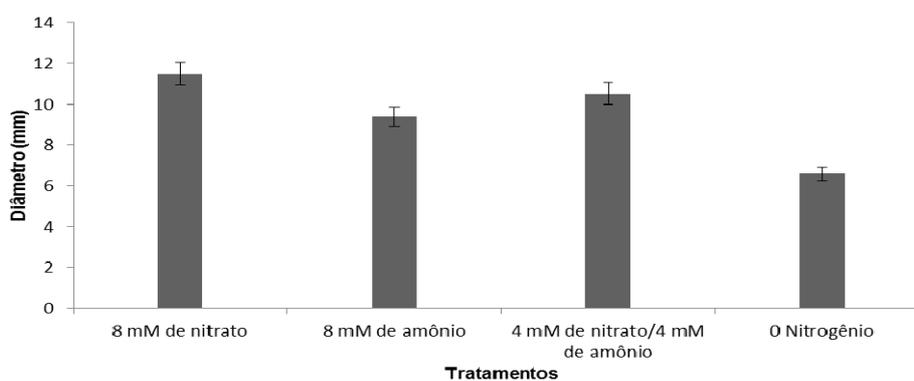


Figura 3 Diâmetro de plantas de seringueira avaliado aos 12 meses de idade em função da fonte e concentração de nitrogênio. As barras correspondem ao erro padrão da média de 8 repetições

## 4.2 Taxa fotossintética

As maiores taxas fotossintéticas foram observadas nas plantas cultivadas com nitrato com ou sem alagamento.

Observa-se aos 21 dias após a indução do alagamento uma redução de aproximadamente 50% na taxa fotossintética nos tratamentos com inundação do sistema radicular independente da fonte nitrogenada aplicada em solução. Essa queda pode ser devido ao fechamento estomático que ocorre em plantas sob hipoxia (JACKSON; HALL, 1987).

A taxa fotossintética no tratamento com 8 mM de amônio se apresenta aproximadamente a metade da observada no tratamento com nitrato desde o início do alagamento. As plantas tratadas com nitrato e amônio apresentaram comportamento semelhante às aquelas nutridas apenas com nitrato, enquanto que nas plantas com ausência de nitrogênio a assimilação de CO<sub>2</sub> mostrou-se baixa e estável com o decorrer do estresse.

A semelhança do que ocorre com estresse hídrico, o fechamento dos estômatos em condição de inundação pode estar associado à síntese do ABA e as aquaporinas. A redução na transpiração e na condutância estomática (dados não apresentados) em plantas de seringueira sob deficiência de oxigênio foram observadas nesse trabalho. Em algumas espécies florestais foi observado um rápido fechamento dos estômatos em resposta a baixa disponibilidade de oxigênio, associado a uma queda brusca na fotossíntese líquida em folhas completamente expandidas.

Estudando o comportamento da condutância estomática em plantas de sesbânia, ameixeira, jacarandá, seringueira e ingá, observou-se uma redução significativa desta em plantas cultivadas sob submersão quando comparadas as cultivadas em normoxia, porém isso não ocorreu em plantas menos sensíveis a submersão do sistema radicular como o açaí (PELACANI, 1993).

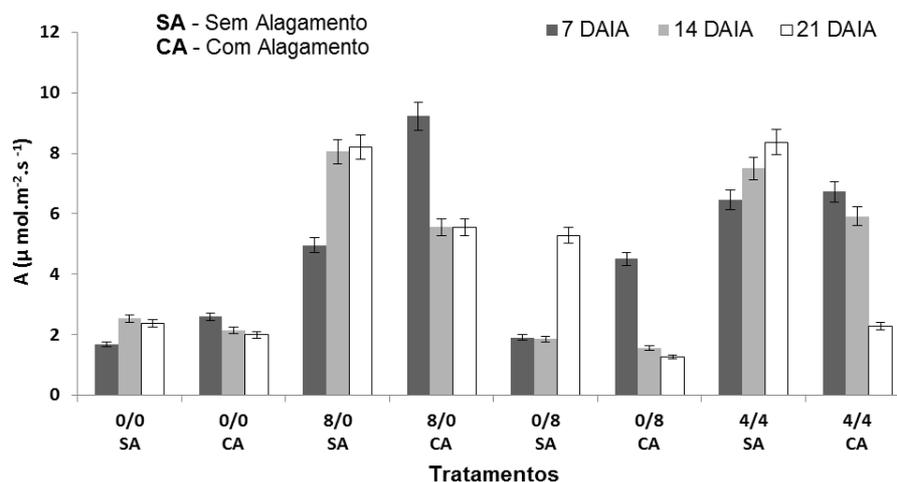


Figura 4 Taxa assimilatória líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (SA e CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 6 repetições

### 4.3 Atividade da Redutase do nitrato (RN)

A atividade da enzima redutase do nitrato apresentou-se superior no tratamento com alagamento desde o início da indução do alagamento, aumentando gradativamente com o prolongamento do estresse (Figura 5). Delú Filho et al. (1998) e Lemos et al. (1999) encontraram valores de atividade semelhantes a esses para atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas de seringueira, porém ambos não trabalharam com alagamento. Ao contrário desses resultados Pelacani (1993) detectou maior atividade da RN em plantas de seringueira em condição normal de disponibilidade de oxigênio quando comparadas as plantas alagadas. No mesmo experimento a autora detectou

maiores atividades da enzima em plantas de ingá e de açaí quando cultivadas com inundação do sistema radicular.

O aumento da atividade da RN em condições de baixa disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo pode ser provavelmente atribuído à redução da competição do oxigênio molecular na cadeia transportadora de elétrons pelo poder redutor originado da via glicolítica (RADIN, 1973).

Crawford (1978) admite que em condições de hipoxia ocorre uma competição pelo poder redutor entre os processos de redução do nitrato e metabolismo anaeróbico, o que limita a formação de etanol sendo esse fato benéfico para as plantas.

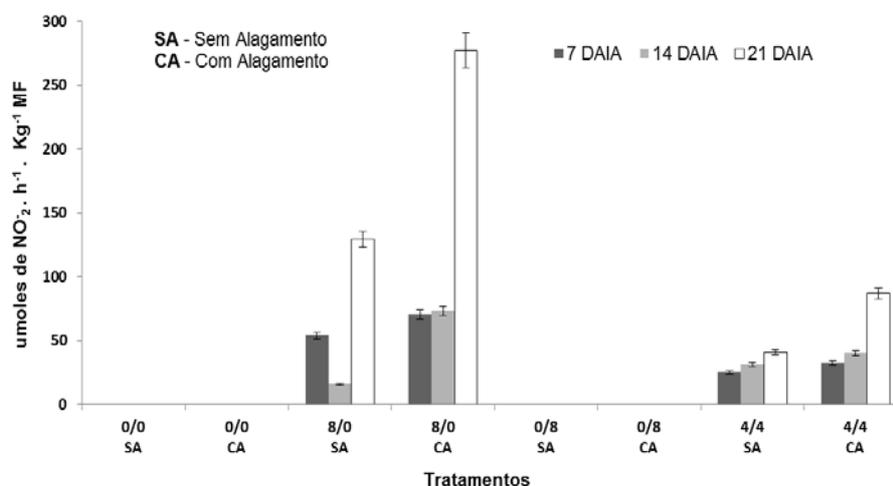


Figura 5 Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (SA e CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### 4.4 Atividade da sintetase da glutamina (GS)

É demonstrado nas figuras 6 e 7 que a atividade da enzima GS em raízes decresceu com o alagamento sendo menor em plantas alagadas independente da fonte nitrogenada. Entretanto nas folhas de um modo geral não ocorreram diferenças.

Em folhas de seringueira a atividade da GS é no mínimo quatro vezes maior quando comparada a atividade em raízes (Figuras 6 e 7). Lemos et al. (1996) mostraram que em plantas jovens de seringueira, cultivadas em diferentes concentrações de nitrato e amônio, existe uma maior atividade da GS em lâminas foliares do que no sistema radicular, resultados semelhantes foram encontrados por Costa Netto (1997) e Delú Filho et al. (1998) quando fornecido nitrato em solução nutritiva. A atividade da GS nas folhas de seringueira depende de outra fonte de amônio, ou seja, a GS foliar não utiliza o nitrogênio absorvido pelas raízes e transportado pelo xilema (figuras 9 e 10), uma vez que, até então, não foi detectada a atividade da RN nesse órgão. Dessa forma, o amônio utilizado pela enzima pode ser derivado da fotorrespiração (WALLSGROVE et al., 1983), originado a partir de metabolismo asparagina, através da ação da asparaginase ou da proteólise (LEA; ROBINSON; STEWART, 1990). Sendo um aspecto que ainda deve ser melhor investigado em *Hevea*. A degradação de proteínas e aminoácidos pode explicar a alta atividade da GS nas folhas das plantas que foram cultivadas na ausência de nitrogênio, já que essas se encontravam em fase de senescência.

Farquhar et al. (1980) defendem que níveis mais elevados das enzimas GS, GOGAT e GDH nas folhas contribuem para uma melhor reassimilação do amônio produzido na fotorrespiração, o que diminui as perdas por volatilização.

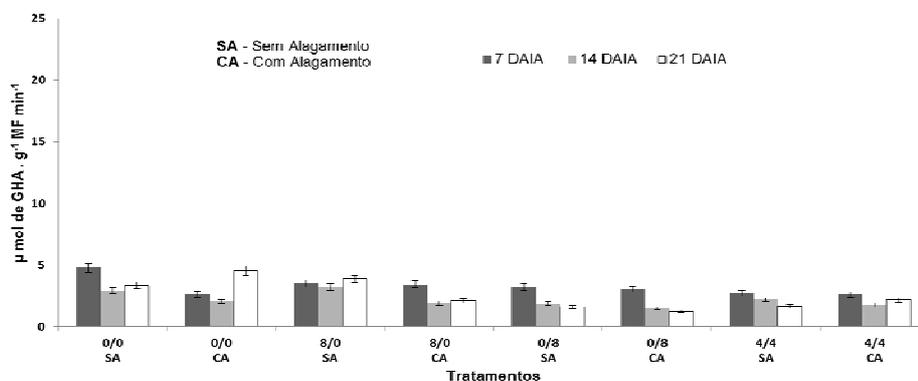


Figura 6 Atividade da enzima Sintetase da Glutamina (GS) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

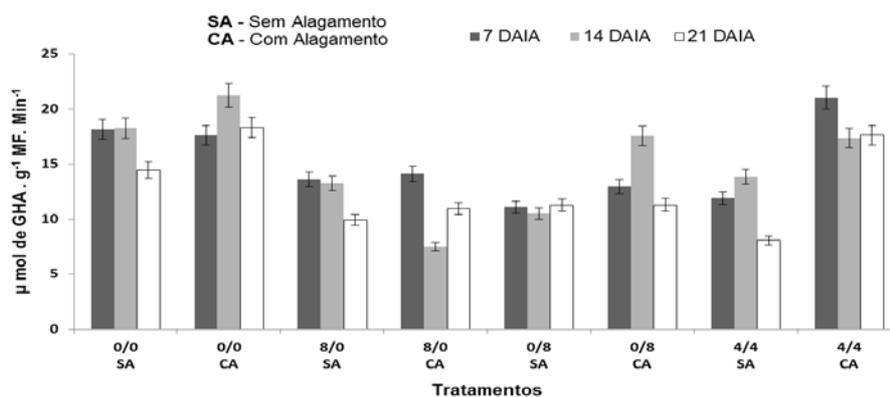


Figura 7 Atividade da enzima Sintetase da Glutamina (GS) em folhas de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### **4.5 Atividade da sintase do glutamato (NADH-GOGAT)**

Não foi detectada atividade da GOGAT nas plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, possivelmente isso ocorreu devido à falta do substrato 2-oxoglutarato, já que nas raízes a baixa disponibilidade de oxigênio limitava a respiração aeróbica e conseqüentemente o ciclo de Krebs que é o fornecedor dessa e outras moléculas chaves como malato. A glutamina o outro substrato trabalhado pela GOGAT provavelmente não limitava a reação, pois se observa alta atividade da GS nessas plantas (figura 6). Nas plantas cultivadas com nitrato a atividade diminuiu quando essas foram submetidas ao alagamento, enquanto que naquelas cultivadas com amônio a atividade da GOGAT foi favorecida pelo alagamento.

Lemos et al. (1999), trabalhando com plantas de seringueira tratadas com nitrogênio e sem indução de estresse, descreveram um aumento na atividade da NADH-GOGAT com a redução na atividade da GS, os autores discutem que a glutamina foi de algum modo fornecida às raízes, possivelmente a partir da parte aérea das plantas ou seja esse aminoácido foi transportado pelo floema.

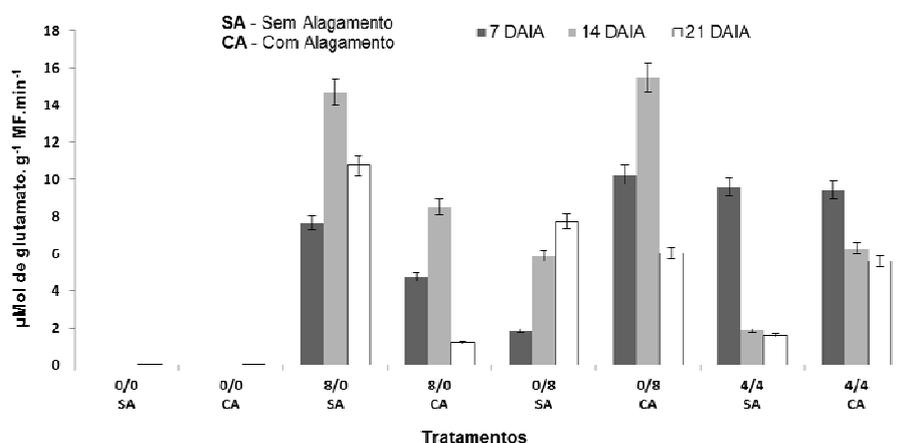


Figura 8 Atividade da enzima Sintase do glutamato (NADH-GOGAT) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### 4.6 Atividade da glutamato desidrogenase (GDH)

A atividade da GDH em raízes de plantas cultivadas com nitrato foi menor nas plantas alagadas, enquanto que nas plantas cultivadas com amônio o alagamento favoreceu a atividade dessa enzima.

Tanto nas folhas como nas raízes das plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, a atividade da GDH mostrou-se baixa quando comparada aos tratamentos com adição deste elemento.

Nas folhas das plantas cultivadas com 8 mM de nitrato e das cultivadas com 8 mM de amônio observou-se uma maior atividade da GDH nas plantas alagadas aos sete e vinte um dias após indução do alagamento.

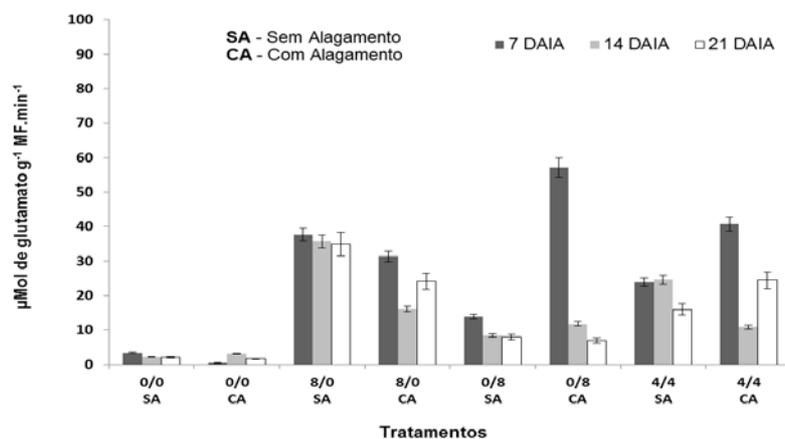


Figura 9 Atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) em raízes de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

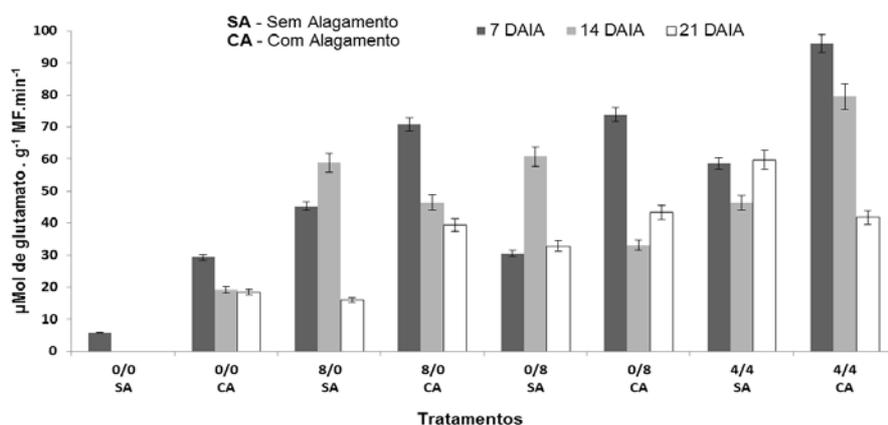


Figura 10 Atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### 4.7 Teores de amônio e nitrato na seiva do xilema

Não foi detectada a presença de nitrato ou amônio na seiva de plantas cultivadas na ausência destes íons. O teor de amônio na seiva xilemática em plantas cultivadas com amônio foi maior nas alagadas (Figura 11).

O transporte de N- amoniacal na seiva xilemática foi no mínimo três vezes maior no tratamento com 8 mM de amônio quando comparado ao tratamento com apenas 4 mM desse cátion. Valor superior (40 nmol) foi encontrado por Diniz (2011) trabalhando com plantas de seringueira nutridas com 8 mM de nitrogênio em condições normais de oxigênio.

O amônio absorvido pelas raízes é incorporado a aminoácidos via GS/GOGAT, esse fato explica as baixas concentrações desse cátion no xilema, além

de ser volátil e tóxico podendo atuar como um desacoplador de membranas, conforme relatado por Givan (1979).

É importante observar que essa pequena quantidade de amônio transportada via xilema, estequiometricamente não foi responsável pela alta atividade da GS encontrada em folhas de seringueira (figura 7).

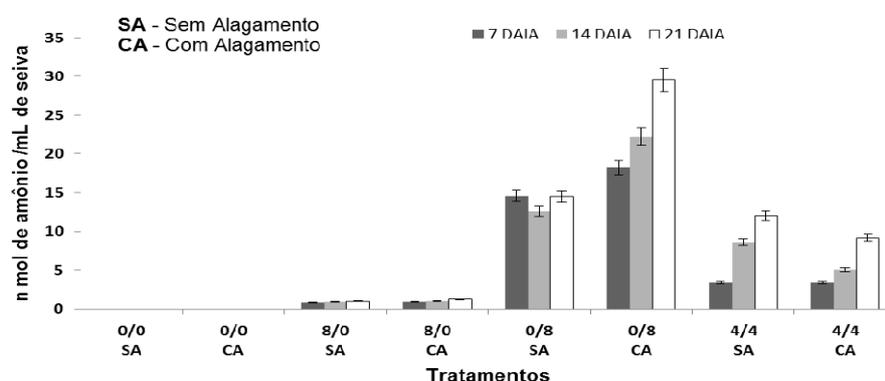


Figura 11 Teor de amônio na seiva xilemática de plantas jovens de seringueira nutridas com apenas amônio na concentração de 8 mM ou com nitrato/amônio na proporção de 4/4 em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliado aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

A figura 12 apresenta o teor de N- nítrico transportado na seiva do xilema das plantas de seringueira. Foi observado que no tratamento com nitrato (8 mM) alagado, esse teor é expressivamente menor quando comparado ao tratamento com 8 mM sem alagamento. A menor exportação de nitrato da raiz para a parte aérea pode ser devido à maior atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas alagadas (figura 5) além da atuação dessa enzima no caule das plantas de seringueira (SHAN, 2007). A concentração mais

baixa na seiva xilemática das plantas do tratamento 4/4 se deve à menor disponibilidade de nitrato para absorção, já que o mesmo estava presente na solução nutritiva na concentração de 4 mM, ao passo que o tratamento com 8 mM continha 8 mM de N-nítrico.

Alves (2001), encontrou valores superiores a esses em plantas jovens de seringueira tratadas com 8 mM de nitrato, variando de 4 micro moles a 16 micro moles em função do tempo em horas após aplicação da solução nutritiva. Já Diniz (2011), obteve resultados aproximadamente quatro vezes menores quando forneceu “8 mM de nitrogênio, sendo 5 mM de  $\text{NO}_3^-$  e 3 mM de  $\text{NH}_4^+$ , para plantas de seringueira, porém, ambas trabalharam em condições de normoxia. O ambiente, a idade da plantas e as condições de cultivo podem ser fatores responsáveis pelas divergências entre os resultados.

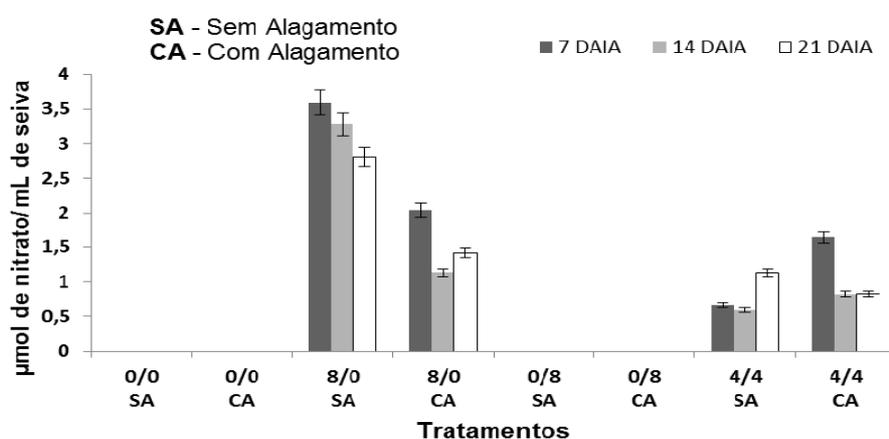


Figura 12 Teor de nitrato na seiva xilemática de plantas jovens de seringueira nutridas com apenas nitrato na concentração de 8 mM ou com nitrato/amônio na proporção de 4/4 em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliado aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### **4.8 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

Nesse trabalho não foi detectada a atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX) em tecidos radiculares.

As plantas cultivadas sem nitrogênio, alagadas e não alagadas apresentaram uma baixa atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nas folhas, não diferindo entre os dias avaliados. Já àquelas cultivadas com 8 mM de nitrato ou 4/4 mM de nitrato/amônio sem algamento tiveram menor atividade da enzima quando comparadas aos tratamentos alagados, que mostrou o maior resultado em relação a todos os tratamentos. As plantas cultivadas com 8 mM de amônio alagadas apresentaram atividade superior da SOD somente aos 21 dias após indução do algamento.

Dentre as enzimas envolvidas na remoção das EROs, a SOD é geralmente a primeira linha no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (POMPEU et al., 2008), podendo ser considerada uma enzima chave nesse processo. O estresse por baixa disponibilidade de oxigênio induziu uma maior atividade da SOD, principalmente nas plantas cultivadas com 8 mM de nitrato, a qual determina a concentração de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , sendo central nos mecanismos de defesa necessários para prevenir a formação de radicais  $OH^-$ , sendo assim, conhecida por conferir tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007).

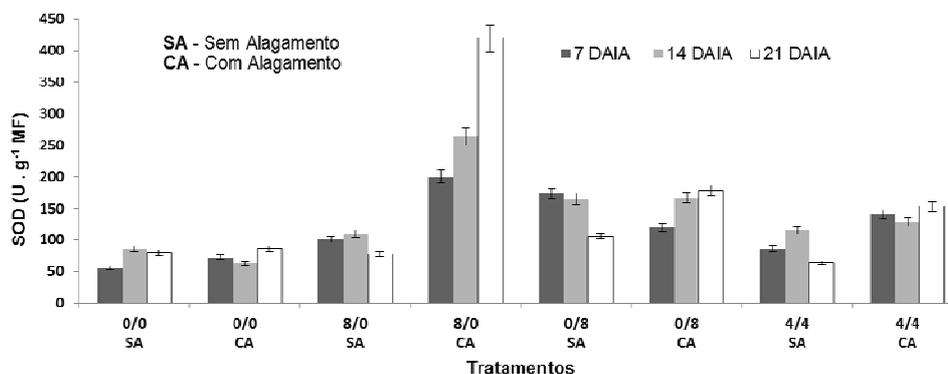


Figura 13 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### 4.9 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase nas folhas (Figura 14) dos tratamentos sem nitrogênio apresentou-se baixa, quando comparada a atividade da enzima dos tratamentos com nitrogênio. As plantas cultivadas com 8 mM de nitrato alagadas tiveram maior atividade dessa enzima somente no último dia avaliado. As plantas tratadas com 8 mM de amônio alagadas tiveram uma maior atividade da CAT no primeiro e último dia avaliado. As plantas cultivadas na proporção 4/4 nitrato/amônio mostraram uma queda em relação a essa enzima nas plantas alagadas.

Em todos os tratamentos observou-se uma atividade da CAT aproximadamente cem vezes menor quando comparada as atividades da SOD e APX (figuras 13 e 15). A CAT tem uma baixa afinidade pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo ativa

somente quando este está em altas concentrações, ou seja, quando o estresse é muito severo.

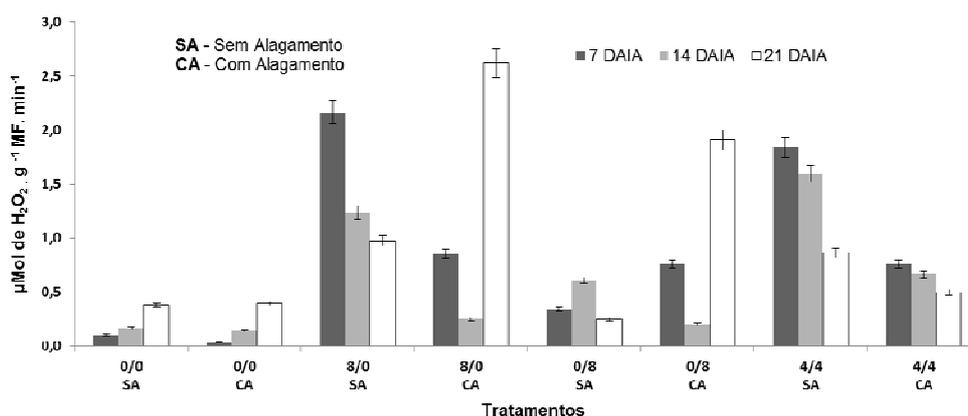


Figura 14 Atividade da enzima catalase (CAT) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições de disponibilidade de oxigênio (sem alagamento - SA e com alagamento - CA) avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### 4.10 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

O alagamento aumentou a atividade da APX em todos os tratamentos independente da fonte nitrogenada. Os resultados da figura 15 mostram que a maiores atividades da ascorbato peroxidase foram verificadas nas plantas tratadas com 8 mM de amônio alagadas. Em folhas de seringueira, foi observada uma atividade 100 vezes maior da APX quando comparada a CAT, sinalizando uma maior atuação da ascorbato peroxidase no processo de eliminação do peróxido de hidrogênio das células. APX e outras peroxidases, ao contrário da

CAT, têm alta afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eliminando-o mesmo em baixas concentrações.

A capacidade de manter, em níveis elevados, a atividade da SOD, CAT e APX, em condições de estresse ambiental, é essencial para manter o equilíbrio entre a formação e remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  do ambiente intracelular (ZHANG; KIRKAM, 1996).

Segundo Blokhina, Virolainen e Fagerstedt (2003), está bem caracterizado que, sob condições de hipoxia no substrato, ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células de plantas, porém as enzimas do sistema antioxidante ainda são pouco estudadas sob estas condições (SAIRAM et al., 2008), e em seringueira não se encontra na literatura nenhum trabalho avaliando o metabolismo antioxidativo em plantas alagadas.

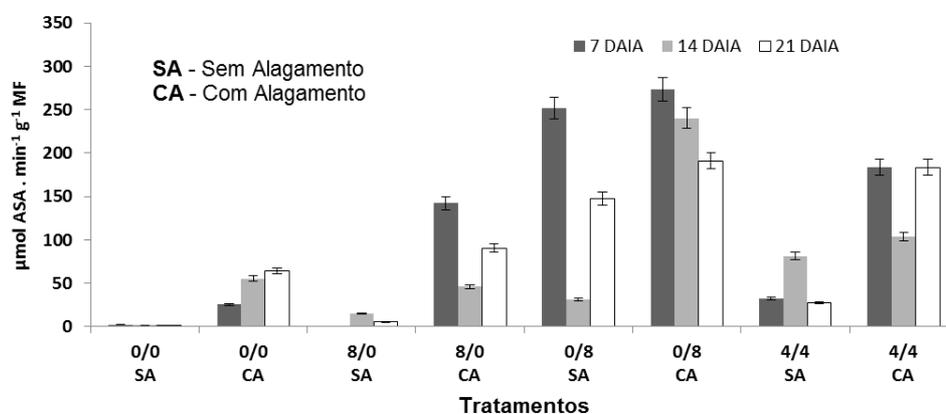


Figura 15 Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira submetidas a 8 tratamentos, sendo, 4 proporções de nitrato/amônio em mM (0/0; 8/0; 0/8 e 4/4) em duas condições ambientais, sem alagamento e com alagamento (SA e CA), avaliada aos 7,14 e 21 dias após indução do alagamento (DAIA). As barras correspondem ao erro padrão da média de 4 repetições

#### **4.11 Avaliação anatômica das raízes**

Observou-se a partir do sétimo dia após indução do alagamento o aparecimento de lenticelas no caule de das plantas submetidas a submersão do sistema radicular. Botelho et al. (1996) e Pelacani (1992) também observaram a formação de lenticelas nas plantas de seringueira cultivadas sob alagamento.

Verificou-se que as plantas tratadas com 8 mM de amônio que não foram submetidas ao alagamento, ou seja, as plantas controle, não apresentaram formação de aerênquimas em nenhuma das avaliações realizadas, uma vez que estas não estavam submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio.

Em contrapartida, nas raízes das plantas com 8 mM de amônio alagadas, foi possível notar o início do alargamento das células do tecido parenquimático no primeiro dia de avaliação, ou seja, sete dias após a indução do alagamento, e na terceira avaliação (21 dias), já se observou a estrutura do aerênquima, como mostrado na Figura 16, que são formados para suprir a baixa concentração de oxigênio do meio onde se encontram as raízes.

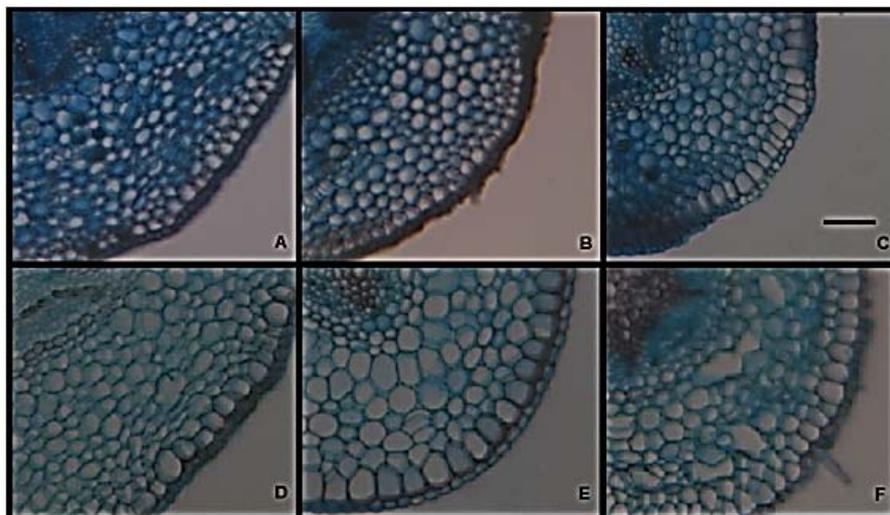


Figura 16 Formação de aerênquimas em secção transversal de raízes laterais de plantas jovens de seringueira cultivadas com 8 mM de Amônio e submetidas a duas condições de disponibilidade de oxigênio: sem alagamento (A, B e C) e com alagamento (D, E e F), avaliada em 7 (A e D), 14 (B e E) e 21 (C e F) dias após a indução do alagamento. A barra (→) corresponde a 100  $\mu$ m

As plantas cultivadas com 8 mM de nitrato sem alagamento apresentaram comportamento similar às cultivadas com 8 mM de amônio sem alagamento, ou seja não ocorreu o desenvolvimento de aerênquimas. Porém, nas plantas cultivadas em ambiente hipóxico, notou-se a formação de aerênquima já aos 14 dias, aumentando o tamanho destes ao longo do tempo, como visto na terceira avaliação (21 dias), mostrado na Figura 17.

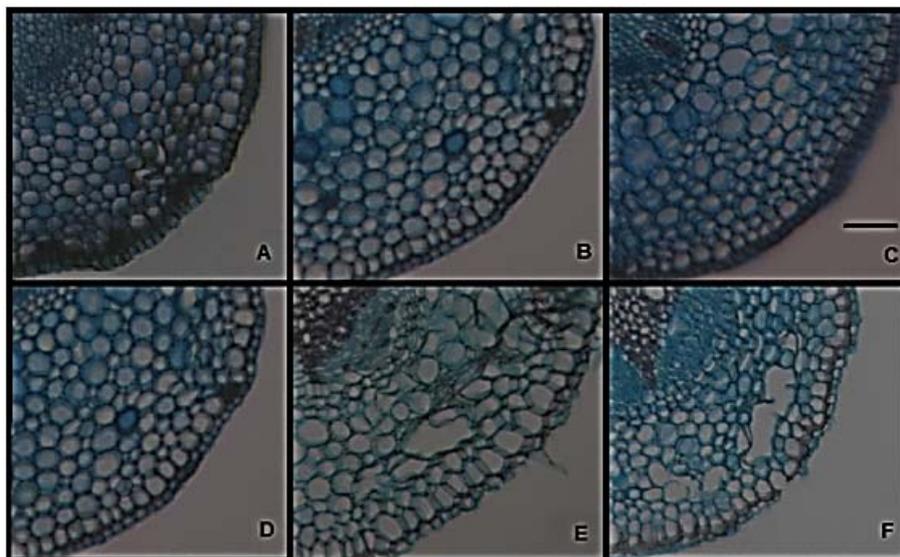


Figura 17 Formação de aerênquimas em secção transversal de raízes laterais de plantas jovens de seringueira cultivadas com 8 mM de Nitrato e submetidas à duas condições de disponibilidade de oxigênio: sem alagamento (A, B e C) e com alagamento (D, E e F), avaliada em 7 (A e D), 14 (B e E) e 21 (C e F) dias após a indução do alagamento. A barra (→) corresponde a 100  $\mu\text{m}$

As plantas cultivadas com nitrato apresentaram um desempenho mais rápido em adquirir uma adaptação morfológica, no caso os aerênquimas, uma estrutura que favorece a adaptação das plantas a condição adversa de ambiente aplicada. É bem conhecido que a adição exógena de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) aumenta a tolerância das plantas ao estresse de hipóxia, mas os mecanismos pelos quais o  $\text{NO}_3^-$  exerce esse efeito não estão esclarecidos (ROCHA et al., 2010).

Entretanto, as plantas nutridas com amônio, também apresentaram essa mudança anatômica, porém mais tardiamente, mostrando dessa forma, que a seringueira tem plasticidade para se adaptar a áreas sujeitas a alagamentos periódicos, como é o caso das áreas em que essa espécie ocorre naturalmente.

Trabalhando com plantas de *Pinus* m condições de hipoxia Topa e McLeod (1986) encontraram a formação de aerênquimas na região do córtex das raízes e a consequente aeração dos tecidos radiculares.

Experimentos realizados com cultivares de milho apresentaram a porosidade aumentada na raiz após 6 h do início do tratamento, aumentando progressivamente a proporção de aerênquimas com a continuidade do estresse anaeróbico. Quando foram feitos cortes anatômicos com 168 horas de alagamento, a área do córtex ocupada pelos aerênquimas aumentou 11 vezes (SOUZA, 2010). Esta resposta mais rápida, mostra que esta espécie em questão é mais tolerante ao alagamento, adquirindo adaptações morfológicas com eficiência para suprir a baixa concentração de oxigênio.

## 5 CONCLUSÕES

O crescimento em altura das plantas não diferiu em função da fonte nitrogenada. Plantas cultivadas com nitrato apresentaram maior crescimento em diâmetro.

As maiores taxas fotossintéticas foram observadas nas plantas cultivadas com nitrato com ou sem alagamento.

A atividade da enzima redutase do nitrato apresentou-se superior no tratamento com alagamento desde o início da indução do mesmo, aumentando gradativamente com o prolongamento do estresse.

Em raízes a atividade da GS foi menor em plantas alagadas independente da fonte nitrogenada. Entretanto nas folhas não ocorreram diferenças.

Não foi detectada atividade da GOGAT nas plantas cultivadas na ausência de nitrogênio, enquanto que nas cultivadas com nitrato a atividade diminuiu quando essas foram submetidas ao alagamento, e naquelas tratadas com amônio a atividade da GOGAT foi favorecida pelo alagamento.

A atividade da GDH em raízes de plantas cultivadas com nitrato foi menor nas plantas alagadas, enquanto que oposto ocorreu nas plantas cultivadas com amônio.

O teor de nitrato na seiva xilemática em plantas cultivadas com nitrato foi menor nas alagadas, sendo que o oposto ocorreu com o teor de amônio nas plantas tratadas com esse cátion. Não foi detectada a presença de nitrato e amônio na seiva de plantas cultivadas na ausência destes íons.

Não foram detectadas atividades da SOD, CAT e APX em raízes de seringueira.

A atividade da SOD nas folhas das plantas cultivadas com nitrato foi maior nas plantas alagadas.

O alagamento aumentou a atividade da APX, nas folhas, de todos os tratamentos.

O desenvolvimento de aerênquimas ocorreu de forma mais pronunciada e rápida em plantas alagadas e nutridas com nitrato.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- ANTUNES, F. et al. Nitrogen stress and the expression of asparagine synthetase in roots and nodules of soybean. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, n. 4, p. 736-743, Aug. 2008.
- APPENROTH, K. J. et al. Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Science**, Clare, v. 159, n. 1, p. 51-56, Jan. 2000.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: KYLE, J.; OSMOND, C. B.; ARNTZEN, K. (Ed.). **Photoinhibition**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 227-287.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, June 2008.
- BARKER, A. V.; MILL, H. A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. **Horticultural Review**, Edinburg, v. 2, p. 395-423, 1980.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 495-522, 1969.
- BEN AHMED, C. et al. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 2, p. 345-352, Dec. 2009.
- BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

- BLEVINS, D. G. An overview of nitrogen metabolism in the higher plants. In: POULTON, J. E.; ROMEO, J. T.; CONN, E. E. (Ed.). **Plant nitrogen metabolism**. New York: Plenum, 1986. p. 234-256.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 5, p. 359-373, May 2010.
- BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 3, p. 179-194, Feb. 2003.
- BOLLE-JONES, E. W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plantans Soil**, Wageningen, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1957.
- BONOME, L. T. S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ExAdr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento**. 2006. 124 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- BOTELHO, M. N. et al. Adaptação morfo-anatômica de plantas jovens de *Inga vera* Willd. e *Virola surinamensis* (Rolland. Ex Rottb.) Warb. à submersão. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica**, Curitiba, v. 14, p. 93-107, 1998.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerante. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, Nov. 1992.
- BRETELER, H.; SIEGERIST, M. Effect of ammonium on nitrate utilization by roots of dwarf bean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 1099-1103, 1984.
- CAMPBELL, W. H. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, n. 2, p. 194-204, Apr. 2001.
- CAMPELO JÚNIOR, J. H. Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2000.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

CLARKE, A. L.; BARLEY, K. P. The uptake of nitrogen salts in relation to solute diffusion. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 6, p. 75-92, 1968.

COSTA NETTO, A. P. **Efeito da presença do nitrogênio exógeno ( $N-NO_3^-$  e/ou  $NH_4^+$ ) sobre a atividade das enzimas de assimilação de amônio e remobilização de reservas durante a germinação e desenvolvimento inicial de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell Arg.)**. 1997. 44 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

CRAWFORD, L. A. et al. The synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. **Plant Physiology**, Washington, v. 104, n. 3, p. 865-871, Mar. 1994.

CRAWFORD, T. T. Metabolic adaptations to anoxia. In: HOOK, D. D.; CRAWFORD, T. T. (Ed.). **Plant life in anaerobic environments**. Ann Arbor: Ann Arbor in Science, 1978. p. 119-136.

DELÚ FILHO, N. et al. Redução do nitrato e assimilação do amônio em plantas jovens de seringueira cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.

DELÚ FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.): otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, n. 3, p. 329-336, maio/jun. 1997a.

\_\_\_\_\_. Efeito de diferentes concentrações de nitrato sobre o crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 21, n. 4, p. 447-454, jul./ago. 1997b.

DINIZ, P. F. A. **Associação de bactérias diazotróficas na assimilação e transporte de nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea spp*)**. 2011. 253 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, n. 1, p. 223-250, June 1997.

FAN, T. W. M. et al. Anaerobic nitrate and ammonium in flood-tolerant rice coleoptiles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1655-1666, Sept. 1997.

FAN, T. W. M.; HIGASHI, R. M.; LANE, A. N. An in vivo <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR investigation of the effect of nitrate on hypoxic metabolism in maize roots. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 266, n. 2, p. 592-606, Dec. 1988.

FARQUHAR, G. D. et al. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: determination on the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 710-714, 1980.

FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Aspectos do metabolismo e utilização do nitrogênio em gramíneas tropicais. In: MATTOS, H. B. et al. (Ed.). **Calagem e adubação de pastagens**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1986. p. 93-123.

FRUGOLI, J. A. et al. Catalase 1s encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 11, n. 2, p. 327-336, May 1996.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GIVAN, C. V. Review: metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, New York, v. 18, n. 3, p. 373-382, 1979.

GONÇALVES, P. S. et al. Estimativas de correlações genéticas e fenotípicas de alguns caracteres quantitativos em clones jovens de seringueira. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 95-107, 1984.

GONÇALVES, P. S.; ROSSETTI, A. G. Resultados preliminares do comportamento de clones de seringueira em Manaus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 99-102, jan. 1982.

GUO, S.; BRÜCK, H.; SATTELMACHER, B. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 2, p. 267-275, 2002.

HAAG, H. P. et al. **Nutrição mineral da seringueira**: marcha de absorção de nutrientes. Campinas: Fundação Cargill, 1982. 86 p.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HAYNES, R. J. Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: \_\_\_\_\_. **Mineral nitrogen in the plant-soil**. Madison: Academic, 1986. p. 303-378.

HEBERER, J. A.; BELOW, F. E. Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. **Annals of Botany**, New York, v. 63, n. 2, p. 643-649, Feb. 1989.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Wien, v. 241, n. 1/4, p. 3-17, May 2010.

JACKSON, K.; HALL, G. Early stomatal closure in waterlogged pea plants in mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 121-130, Mar. 1987.

JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 31, n. 3, p. 427-436, May 2009.

\_\_\_\_\_. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 110-116, Oct. 2007.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 3, p. 817-821, 1994.

KANT, S. et al. Partial substitution of  $\text{NO}_3^-$  by  $\text{NH}_4^+$  fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 3, p. 303-311, June 2007.

KAWASE, M. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **HortScience**, Virginia, v. 16, n. 1, p. 30-33, Feb. 1981.

KOZLOWSKI, T. T. Plant responses to flooding of soil. **BioScience**, Washington, v. 34, n. 3, p. 162-167, Jan. 1984.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic, 1997. 411 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: UFRRJ, 1997. 127 p.

LAM, H. M. et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569-593, 1996.

LE HABA, A. P. de et al. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. **Plant Science**, Shannon, v. 161, n. 2, p. 231-237, 2001.

LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: MIF-LIN, B. J.; LEA, P. L. (Ed.). **The biochemistry of plants: intermediary nitrogen metabolism**. New York: Academic, 1990. p. 121-159.

LEA, U. S. et al. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 1, p. 1085-1094, Jan. 2006.

LEMOS, G. B. **Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis*Müell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio**. 1996. 56 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

LEMOS, G. B. et al. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 113-118, 1999.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 2, p. 148-157, Apr. 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2000. v. 1, 352 p.

MAGALHÃES, J. R.; HUBER, D. M.; TSAI, C. Y. Influence of the form of nitrogen on ammonium, amino acids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 747-763, Dec. 1995.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 631 p.

MANIVANNAN, P. et al. Protection of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. plants from salt stress by paclobutrazol. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 315-318, Feb. 2008.

MARINHO, J. T. S. **Seringueira: opções de cultivo e geração de renda na Amazônia**. Disponível em: <<http://www.cpaufac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/seringa>>. Acesso em: 29 jun. 2012.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 297-304, 1967.

MENEGUS, F. et al. Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. **Plant Physiology**, Washington, v. 90, n. 1, p. 29-32, May 1989.

MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signalling. In: LEA, P. J.; MOROT-GAUDRY, J. F. (Ed.). **Plant nitrogen**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 39-59.

MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, Bruxelles, v. 15, n. 6, p. 873-885, 1976.

MILBURN, J. A.; RANASINGHE, M. S. A comparison of methods for studying pressure and solute potentials in xylem and also in phloem laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 135-143, Jan. 1996.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

OTA, K.; YAMAMOTO, Y. Promotion of assimilation of ammonium ions by simultaneous application of nitrate and ammonium ion in radish plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 365-371, 1989.

PANDA, S. K.; KHAN, M. H. Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 195, n. 6, p. 442-454, June 2009.

PELACANI, C. R. **Estratégias de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular**. 1993. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1993.

POMPEU, G. B. et al. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, Sept. 2008.

RADIN, J. W. In vivo assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 1, p. 332-336, 1973.

REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Higher plant response to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, n. 4, p. 640-650, 1991.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 32, n. 1, p. 1-10, Jan. 1994.

ROBERTS, J. K. M. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, n. 2, p. 480-487, Feb. 1992.

ROCHA, M. et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 152, n. 3, p. 1501-1513, Jan. 2010.

ROSADO, P. L.; PIRES, M. D. M.; SANTOS, D. F. D. Borracha natural: mercado externo e interno. In: ALVARENGA, A. D. P. et al. (Org.). **Seringueira: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento**. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 49-72.

SAIRAM, R. K. et al. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 52, n. 3, p. 401-412, May 2008.

SANDOVAL-VILLA, M.; ALCANTARA-GONZALES, G.; TIRADO-TORRES, J. L. Use of ammonium in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 18, n. 7, p. 1449-1457, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCHMIDT, S.; STEWART, G. T. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. **Tree Physiology**, Victoria, v. 18, n. 6, p. 403-410, Oct. 1998.

SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, Stanford, v. 52, n. 1, p. 119-125, July 1964.

SECCO, R. S. A botânica da seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. exAdr. Jussieu) Muell.Arg.)]. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C. A. F. S. do (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 3-24.

SHAN, A. Y. K. V. **Assimilação de nitrogênio em plantas jovens de seringueira [*Heveabrasilensis* (Willd. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.] e caracterização de lipídeos durante o armazenamento de sementes**. 2007. 124 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SOLOMONSON, L. P.; BARBER, M. J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 225-253, 1990.

SOUZA, K. R. D. **Desenvolvimento de aerênquima e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

STITT, M. et al. Steps towards an integrates view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

STOERMER, H. et al. Nitrogen distribution in young Norway spruce (*Piceaabies*) trees as affected by pedospheric nitrogen supply. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 764-769, Dec. 1997.

STOHR, C.; STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 463-470, Feb. 2006.

STREETER, J. G.; THOMPSON, J. F. Anaerobic accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.). **Plant Physiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 572-578, Apr. 1972.

SUBBAIAH, C. C.; SACHS, M. M. Review article: molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 2, p. 119-127, Jan. 2003. Supplement.

TOPA, M. A.; MCLEOD, K. W. Aerenchyma and lenticel formation in pine seedlings: a possible avoidance mechanism to anaerobic growth conditions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 68, n. 3, p. 540-550, Nov. 1986.

TOURNAIRE-ROUX, C. et al. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. **Nature**, London, v. 425, n. 3, p. 393-397, Sept. 2003.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 3-20, Jan. 1997.

VISSER, E. J. W.; VOESENEK, L. A. C. J. Acclimation to soil flooding: sensing and signal-transduction. **Plant and Soil**, The Hague, v. 254, n. 1, p. 197-214, July 2004.

WALLSGROVE, R. M. et al. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 301-309, 1983.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 207-228, Sept. 1995.

ZHANG, J.; KIRKAM, M. B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 149, n. 5, p. 498-493, Feb. 1996.