



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**FOTOSSÍNTESE, ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO E  
METABOLISMO ANAERÓBICO EM PLANTAS DE INGÁ (*Inga vera*  
Willd.) DURANTE PERÍODOS DE SUBMERSÃO TOTAL E PÓS-  
SUBMERSÃO**

**ROBERTO LISBOA CUNHA**

**2003**

**ROBERTO LISBOA CUNHA**

**FOTOSSÍNTESE, ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO E  
METABOLISMO ANAERÓBICO EM PLANTAS DE INGÁ (*Inga vera*  
Willd.) DURANTE PERÍODOS DE SUBMERSÃO TOTAL E PÓS-  
SUBMERSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

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

Cunha, Roberto Lisboa

Fotossíntese, assimilação do nitrogênio e metabolismo anaeróbico em plantas  
de ingá (*Inga vera* Willd.) durante períodos de submersão total e pós-submersão /  
Roberto Lisboa Cunha. – Lavras : UFLA, 2003.

63p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ingá. 2. Submersão. 3. Anoxia. 4. Assimilação do nitrogênio. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.32104133  
-634.973321

**ROBERTO LISBOA CUNHA**

**FOTOSSÍNTESE, ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO E  
METABOLISMO ANAERÓBICO EM PLANTAS DE INGÁ (*Inga vera*  
Willd.) DURANTE PERÍODOS DE SUBMERSÃO TOTAL E PÓS-  
SUBMERSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Nelson Delú Filho

UNINCOR/ Três Corações-MG

Prof. Dr. Cláudio José Reis de Carvalho

EMBRAPA/Amazônia Oriental-PA



Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**DEDICO:**

À vida.....

Aos meus pais, Maria e Walter, pelo incentivo, dedicação e amor.

Aos meus irmãos, Patrícia, Christian e Augusto.

Aos meus sobrinhos, Giovanni e Lorena.

Em especial a minha “namorada”, Elisa, pelos momentos felizes que passamos em Lavras, no decorrer desse trabalho, sua paciência e compreensão nos momentos difíceis da nossa caminhada.

**“FELIZES SÃO AQUELES QUE ACREDITAM SEM VER”**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais, aos irmãos e a todos os familiares pelo incentivo.

À Universidade Federal de Lavras pela oferta do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

A Elisa pela sincera compreensão e amor.

Ao Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira pelos ensinamentos, orientação e como exemplo profissional durante o curso de Mestrado.

Ao professor Nelson Delú Filho pelas sugestões, colaborações neste trabalho e participação na defesa de dissertação.

Ao pesquisador Cláudio José Reis de Carvalho (EMBRAPA/ Amazônia Oriental), pelas valiosas sugestões e participação na defesa de dissertação.

Aos professores Ângela Maria Soares, José Donizeti Alves e Amauri Alvarenga, pelos ensinamentos.

Aos colegas da EMBRAPA/Amazônia Oriental; Dr. Moacyr Bernardino Dias-Filho, Dr. Olinto Gomes Rocha Neto, Ms. Edmar Urano, pela amizade e ensinamentos durante minha permanência como estagiário.

Aos demais colegas: Alessandro, Ana Hortência, Artiaga, Aurélio, Barone Breno, Cíntia, Clara, Cláudia, Cláudio, Daniela, Darlan, Érico, Edna, Fabiano, Giandrê, Gustavo, Guto, João Paulo, Leandro, Luciano, Lucinea, Marco Antônio, Raírys, Raniere, Rúbia, Rupert, Sabrina, Sandra, Sílvia, Sílvia Mara e Vânia, pela saudável convivência.

Ao Prof. Antônio Cláudio Davide pela concessão das mudas

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal, Evaristo, Izonel, Joel, Lena, Odorêncio e Tanhan, pelo suporte técnico dado ao trabalho.



## **BIOGRAFIA**

ROBERTO LISBOA CUNHA, filho de Walter da Silva Cunha e Maria Consuelo Lisboa Cunha, nasceu em 20 de maio de 1978, em Belém-PA. Iniciou o curso de Bacharelado em Biologia na Universidade Federal do Pará-PA, em 1997, concluindo-o em 2001. Em Fevereiro do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras -MG (UFLA), concluindo-o em fevereiro de 2003.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Deficiência de oxigênio: normoxia, hipoxia e anoxia.....	2
2.2 Conseqüências da hipoxia e anoxia na respiração.....	3
2.3 Conseqüências da hipoxia e anoxia na fotossíntese.....	5
2.4 Conseqüências da hipoxia e anoxia sobre metabolismo do nitrogênio.....	7
2.5 Conseqüências da hipoxia e anoxia na morfologia e anatomia vegetal.....	9
2.6 Resposta a normoxia de plantas pós-submersas.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Época e localização do experimento.....	12
3.2 Material vegetal e sistema de cultivo.....	12
3.3 Tratamento e avaliações.....	13
3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	15
3.5 Características avaliadas.....	15
3.5.1 Caracterização do ambiente.....	15
3.5.2 Croqui ilustrativo do tanque de submersão.....	16
3.5.3 Fotossíntese potencial ( $A_{max}$ ).....	17
3.5.4 Trocas gasosas.....	18
3.5.5 Análises químicas.....	18
3.5.5.1 Quantificação de clorofilas.....	18
3.5.5.2 Ensaio da redutase do nitrato.....	19
3.5.5.3 Extrações e análises química.....	19
3.5.5.3.1 Preparo do material.....	19
3.5.5.3.2 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	20
3.5.5.3.2.1 Desidrogenase alcoólica.....	20
3.5.5.3.2.2 Desidrogenase do lactato.....	21
3.5.5.3.2.3 Sintase do glutamato dependente da NADH.....	21
3.5.5.3.2.4 Açúcares solúveis totais.....	21
3.5.5.3.2.5 Açúcares redutores.....	22
3.5.5.3.2.6 Proteínas.....	22
3.5.5.3.2.7 Aminoácidos.....	23
3.6 Características morfológicas e biométricas.....	23
3.7 Características anatômicas.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Caracterização do ambiente.....	24



4.2	Teores de O <sub>2</sub> dissolvido na solução nutritiva do tanque de submersão.....	26
4.3	Características morfológicas, biométricas e observações visuais.....	27
4.4	Resposta da curva de fotossíntese potencial versus densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo ( <i>A versus DFFFA</i> ).....	31
4.5	Fotossíntese potencial, conteúdo de clorofilas.....	33
4.6	Açúcares redutores, solúveis totais, proteínas e aminoácidos.....	38
4.7	Atividade das enzimas desidrogenase alcoólica e láctica .....	42
4.8	Atividade das enzimas redutase do nitrato (RN), e sintase do glutamato (GOGAT-NADH).....	44
4.9	Período pós – submersão.....	47
4.9.1	Indicadores de recuperação.....	47
4.9.2	Trocas gasosas.....	48
4.9.3	Fotossíntese potencial.....	50
4.9.4	Teor de clorofilas.....	51
4.9.5	Anatomia de raízes.....	52
5	CONCLUSÕES.....	54
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## RESUMO

CUNHA, Roberto Lisboa. **Fotossíntese, assimilação do nitrogênio e metabolismo anaeróbico em plantas de ingá (*Inga vera* Willd.) durante períodos de submersão total e pós-submersão:** UFLA, 2003. 63p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia /Fisiologia Vegetal)\*

Objetivou-se, neste trabalho, estudar o comportamento das plantas de ingá (*Inga vera* Willd.) durante períodos de submersão total e pós-submersão. Plantas com 3 a 4 meses de idade foram previamente selecionadas conforme um padrão de tamanho e cultivadas em vaso plástico de 3,0 L contendo areia lavada como suporte para o crescimento e mantidas com solução nutritiva. Posteriormente, os vasos com as plantas foram transferidos para o interior de um tanque de concreto, no qual permaneceram sob condição de completa submersão. Aos 0, 3, 7, 15, 50, 75, 80, 85 e 90 dias após indução dos tratamentos (DAIT) foram avaliados a taxa fotossintética potencial e os teores de clorofilas. Aos 0, 3, 7, 15, 75, e 85 DAIT, foram avaliados os teores de carboidratos, aminoácidos, proteínas, assimilação do nitrogênio e as atividades das enzimas desidrogenase alcoólica e láctica. A concentração de  $O_2$  na solução nutritiva dentro dos vasos submersos após 1 DAIT foi de  $1,4 \text{ mg de } O_2 \text{ L}^{-1}$  e, no segundo dia,  $0 \text{ mg de } O_2 \text{ L}^{-1}$ , ocasionando uma completa anoxia. Verificou-se uma redução no crescimento, na fotossíntese, nos teores de clorofilas e na assimilação do nitrogênio. Os teores de açúcares solúveis totais caíram apenas nas folhas. Entretanto, observou-se aumento na atividade das enzimas desidrogenase alcoólica e láctica em raízes e folhas das plantas totalmente submersas. Após 75 DAIT, as plantas foram retiradas da condição de submersão e avaliaram-se periodicamente trocas gasosas, fotossíntese potencial e teores de clorofilas. Os valores de fotossíntese potencial, fotossíntese líquida e teores de clorofilas se equipararam aos das plantas não submersas após 10 dias do início do período pós-submersão.

---

\*Comitê de Orientação: Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA (Orientador), Prof. Dr. Nelson Delú Filho – UNINCOR e Cláudio José Reis de Carvalho – EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém, PA).

## ABSTRACT

CUNHA, Roberto Lisboa. **Photosynthesis, nitrogen assimilation and anaerobic metabolism in Inga plants (*Inga vera* Willd.) during and after complete submergence**: UFLA, 2003. 63p. (Dissertation – Master in Agronomy - Plant Physiology)\*

The aim of this work was to study the behavior of inga plants (*Inga vera* Willd.) during and after submergence periods. Plants ageing 3 to 4 months were previously chosen following a height pattern, grown in 3.0 L plastic pots containing river sand and kept in a nutritious solution. Thereafter, the plants were transferred into reservoir, where were kept in fully submergence. At 0, 3, 7, 15, 50, 75, 80, 85 and 90 days after treatments induction (DATI), the potential photosynthetic rate and the chlorophyll content were determined. At 0, 3, 7, 15, 75 and 85 DATI, we determined the soluble sugar, amino acid and protein contents, nitrogen assimilation and the alcohol and lactate dehydrogenase activities. The O<sub>2</sub> level of the nutritious solution in the submergence plastic pots at 1 DATI was 1.4 mg. O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and at day two was 0.0 mg. O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, resulting in complete anoxia. The submergence reduced plant growth, photosynthesis, chlorophyll contents and nitrogen assimilation. Soluble sugar contents decreased only in leaves. However, alcohol and lactate dehydrogenase activities were increased in both roots and leaves of fully submerged plants. After 75 DATI plants were removed from submergence and were evaluated gas exchange, potential and liquid photosynthesis values and chlorophylls content. Photosynthesis and chlorophylls content were recovered up to the levels of control plants ten days after the submergence period.

---

\*Guidance Committee: Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Major Professor), Prof. Dr. Nelson Delú Filho – UNINCOR e Cláudio José Reis de Carvalho – EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA).

## 1 INTRODUÇÃO

O ingazeiro (*Inga vera* Willd) é uma planta comumente encontrada em ecossistemas florestais e, especialmente, em regiões de matas ciliares. Por esta razão, a sua utilização pode ser recomendada para reflorestamento e revegetação de margens de cursos d'água e represas. Quando submetido a condições de solos e ou situações com baixa disponibilidade de oxigênio, tem sido observado que o ingazeiro apresenta modificações no seu comportamento fisiológico, adaptando-se e sobrevivendo a condições de submersão parcial e total (Tribuzy, 1998; Oliveira et al., 1999).

Vários efeitos da deficiência de oxigênio sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas são conhecidos, os quais limitam processos fisiológicos diversos, tais como: a fotossíntese, o particionamento do carbono, a absorção de nitrogênio do solo e a assimilação do nitrogênio fixado. Sendo assim, a maioria dos tecidos vegetais desenvolve adaptações morfológicas e fisiológicas para prolongar a sobrevivência em condições de baixa disponibilidade de oxigênio promovidas pela submersão parcial ou total das plantas (Drew, 1997; Vervuren et al., 1999; Visser et al., 2003). Tais situações induzem a uma senescência gradual da vegetação, havendo algumas espécies mais tolerantes e outras mais sensíveis (David et al., 1997; Oliveira et al., 1999), dependendo da altura da lâmina d'água e da duração dos períodos de submersão.

Alguns trabalhos têm sido conduzidos com a finalidade de compreender o comportamento e as estratégias de sobrevivência de várias espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas em ambientes inundados em condições naturais de campo e semicontrolados de simulação de inundação de inundação (Ishida, 1998; Tribuzy, 1998; Oliveira et al., 1999). Entretanto, a recuperação das plantas pós-submersão tem sido pouco estudada.

O ingazeiro é uma espécie promissora para uso em áreas de depleção ou em programas de revegetação de mata ciliar. Tribuzy (1998), trabalhando em condições de campo em área de depleção no reservatório hidrelétrico de Camargos, MG, BRASIL, verificaram que, dentre as espécies arbóreas, o ingazeiro foi a que melhor se adaptou, sobrevivendo inclusive, quando sujeita ao maior período de submersão e a uma maior coluna d'água. Nesses trabalhos, entretanto, observaram-se apenas variáveis relacionadas a um pequeno período de submersão, mas não foram feitas observações das características fisiológicas avaliadas no período de pós-submersão.

O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de atender os seguintes objetivos: (1) avaliar a capacidade de sobrevivência do ingazeiro a um período prolongado de submersão total; e (2) avaliar a capacidade de recuperação de suas principais características fisiológicas após este período. Tais objetivos foram viabilizados a partir de avaliações, em raízes e folhas, de características biofísicas (crescimento, trocas gasosas e fotossíntese potencial) e bioquímicas (teores de carboidratos, clorofilas, e atividade das enzimas desidrogenase alcoólica e lática, redutase do nitrato e sintase do glutamato).

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Deficiência de oxigênio: normoxia, hipoxia e anoxia**

Quando o solo é submerso, as trocas gasosas entre o solo e o ar são dramaticamente reduzidas. O oxigênio e outros gases atmosféricos podem penetrar no solo apenas pela difusão na superfície da água e, nessas condições, o O<sub>2</sub> dissolvido é rapidamente consumido pelo sistema radicular e pelos microorganismos presentes (Vartapetian & Jackson, 1997), inclusive promovendo uma completa anoxia no sistema radicular (Visser et al., 2003). Os

termos normoxia, hipoxia e anoxia são usados para indicar a disponibilidade de  $O_2$  às plantas. Sendo que a normoxia ocorre quando o suprimento de  $O_2$  não limita a fosforilação oxidativa. Sob hipoxia, a pressão parcial de  $O_2$  limita a produção de ATP pelas mitocôndrias e a anoxia ocorre quando a produção de ATP pela fosforilação oxidativa é desprezível, em relação ao ATP gerado pela glicólise e fermentação (Drew, 1997).

Na natureza, freqüentemente a hipoxia precede a anoxia em raízes submersas. Isso porque, nessa condição o oxigênio do solo e, conseqüentemente, nos tecidos das plantas, decresce gradualmente, promovendo diminuição na carga energética e limitando a respiração aeróbica. Porém, algumas espécies se adaptam a estes ambientes, por apresentarem mecanismos que favorecem o aumento do fluxo glicolítico e a produção de ATP, fazendo com que prolongue o seu período sobrevivência (Crawford, 1978).

Segundo Ito et al. (1999), durante o período de submersão a sobrevivência do vegetal é fortemente afetada não apenas pela altura da coluna d'água, mas também pelas características físico-químicas da água, tais como concentrações de  $O_2$  e  $CO_2$ , turbulência, turbidez, pH da água, etc.

## **2.2 Conseqüências da hipoxia e anoxia na respiração**

Plantas superiores são obrigatoriamente organismos aeróbicos e necessitam do oxigênio molecular para permitir a respiração e várias outras reações de oxidação para manter a vida (Vartapetian & Jackson, 1997; Rawlyer et al., 2002; Visser et al., 2003). Sob condições de extrema deficiência do  $O_2$ , a respiração mitocondrial cessa pela falta de um acceptor terminal de elétrons e, sendo assim, a glicólise e a fermentação podem exceder o metabolismo aeróbico nas células vegetais e tornar-se, inclusive, a única via de produção de energia. Como resultado, a geração de ATP por mol de glicose metabolizada declina e,

conseqüentemente, o ciclo dos ácidos tricarbóxicos paralisa e somente a glicólise pode continuar durante a anoxia. Processos de fermentação, como a etanólica e láctica, são os mais importantes para converter NADH a NAD<sup>+</sup> durante a ausência do oxigênio (Kennedy et al., 1992; Drew, 1997).

Segundo Crawford (1978), o baixo rendimento energético do metabolismo anaeróbico geralmente é compensado pela aceleração da glicólise, o chamado “efeito Pasteur”, para satisfazer às suas exigências por ATP. Este processo resulta em uma elevada produção de etanol e/ou lactato, podendo levar à desorganização das membranas celulares, alterando sua fluidez, permeabilidade e transporte, decorrentes da solubilização dos lipídeos das membranas de organelas citoplasmáticas, como as mitocôndrias e provocar a morte das células. Summers et al. (2000) observaram uma eficiente mobilização de polissacarídeos de reserva (“efeito Pasteur”), especialmente na parte aérea de *Potamogeton pectinatus* sob condições de anoxia, promovendo aumento na taxa glicolítica nos tecidos. Entretanto, muitas espécies diminuem o metabolismo ao nível mínimo apenas para manutenção da sua sobrevivência (Zhang & Greenway, 1994; Vartapetian & Jackson, 1997).

A explicação para o fato de algumas plantas serem mais tolerantes do que outras em condições de baixa disponibilidade de oxigênio está relacionada com as características fisiológicas e bioquímicas do organismo (Fox et al., 1994; Drew, 1997; Vartapetian & Jackson, 1997; Kozłowski, 1997 e Liao & Lin, 2001). A tolerância ao estresse está estritamente associada à situação em que a espécie vegetal mantenha o suprimento de energia, a carga energética do adenilato por longo tempo, minimizando o impacto do estresse (Drew, 1997; Vartapetian & Jackson, 1997; Blokhina, 2000; Visser et al., 2003). Fox et al. (1994) verificaram também que todas as enzimas do ciclo de Krebs apresentaram atividade e estariam presentes na mitocôndria, sugerindo que a glicólise não é a única via para produção de ATP suficiente para manutenção da



taxa de crescimento observada em *E. phyllopogon* em condições anaeróbicas. Plaxton (1996) menciona que a glicólise pode fornecer flexibilidade metabólica para facilitar o desenvolvimento e aclimatação ao estresse ambiental.

Outro importante fator comum de morte celular devido à ausência de oxigênio é a acidificação do citoplasma com produtos da fermentação (Roberts et al., 1984), podendo a acidez do citoplasma ser prevenida pela extrusão de prótons (Xia & Roberts, 1996; Saglio et al., 1999; Chen et al., 2000). Em condições de fermentação anaeróbica, o piruvato pode ser convertido principalmente a etanol e lactato, além de outros produtos como alanina, malato e succinato (Souza, 2002).

Huang & Johnson (1995) mencionam que espécies tolerantes à hipoxia estão associadas à baixa taxa respiratória e acumulação de açúcares em condições de deficiência de oxigênio.

Muitas dessas adaptações metabólicas induzem a *síntese de novo* de proteínas, mais notadamente as isoformas das desidrogenases alcoólica e láctica, específicas do estresse anaeróbico (Perata & Alpi, 1993; Pezeshki, 1996; Drew, 1997; Vartapetian & Jackson, 1997; Kato-Noguchi, 1999). Além disso, verifica-se que o pré-tratamento hipóxico ajuda a prolongar a sobrevivência da planta, quando submetidas a anoxia prolongada (Water et al., 1991; Xia & Saglio, 1992).

### **2.3 Conseqüências da hipoxia e anoxia na fotossíntese**

A submersão total da planta prejudica a fotossíntese devido à redução do acesso à luz e aos gases atmosféricos especialmente oxigênio e dióxido de carbono. O impedimento da respiração, decréscimo ou a paralisação da fotossíntese podem levar à morte. Algumas plantas apresentam plasticidade em se adaptar, para permitir tolerância a variações hidrológicas, incluindo

especialmente alternância entre ambientes terrestres e aquáticos (Vervuren et al., 1999). Wells & Pigliucci (2000) consideram que plasticidade fenotípica é a propriedade do genótipo em alterar seu desenvolvimento em resposta a mudanças ambientais. Mauchamp et al. (2001) verificaram que o ajustamento na atividade fotossintética está provavelmente relacionado com a capacidade de alongação do internódio, mudanças na morfologia da planta e mobilização de nutrientes para os tecidos submersos. O mesmo autor verificou que o mecanismo de plasticidade envolve tolerância à submersão em plantas jovens de *Phragmites australis* para manter a sobrevivência durante o período de crescimento em condições desfavoráveis.

Mudanças fisiológicas associadas com a submersão parcial e/ou total das plantas ocasionam redução na condutância estomática, redução na taxa fotossintética, associada com a redução na atividade da Rubisco (Joseph & Yelenosky, 1991; Liao & Lin, 1994; Pezeshki et al., 1996; Lopez & Kursar, 1999), assim como a redução no conteúdo de clorofilas e variações na relação clorofila *a:b* (Ishida, 1998; Tribuzy, 1998; Gardiner & Krauss, 2001; Ahmed et al., 2002).

Segundo Vervuren et al. (1999) e Nabben (1999), vários fatores afetam a fotossíntese em condições de submersão. Entre eles podemos citar: mudança na intensidade e qualidade da luz, redução na disponibilidade de CO<sub>2</sub> e, principalmente, O<sub>2</sub> em plantas sob completa submersão. Uma possível explicação para o menor valor de fotossíntese em plantas sob condições de ambiente submerso está relacionado com a plasticidade fotossintética em função da baixa disponibilidade de luz (Vervuren et al., 1999).

Blom et al. (1994) e Vervuren et al. (1999) verificaram que a sobrevivência de espécies de gramíneas totalmente submersas é relativamente alta, durante o período de exposição à luz, em comparação ao período de exposição ao escuro. Isso indica que a fotossíntese tem uma importante função

nesse ambiente fornecendo oxigênio. Também Fernandez et al. (1999) observaram que folhas de *Psidium ovatifolium* em condições de submersão total no período entre quatro dias e quatro meses apresentavam taxa fotossintética líquida e condutância foliar similar às folhas em condições de não submersão, indicando uma manutenção da capacidade fotossintética.

Gardiner & Krauss (2001) verificaram que o declínio na taxa fotossintética em plantas de *Cherrybark oak* mantidas sob submersão do sistema radicular, está associado com a diminuição na eficiência do uso do N em folhas, promovendo futuras evidências de que a submersão danifica o mecanismo fotossintético.

Huang & Johnsen (1995) observaram, em plantas de trigo submetidas a hipoxia do sistema radicular, que a redução na concentração de sacarose, glicose e frutose na folha poderia estar relacionada com o decréscimo na fotossíntese. Entretanto, nas raízes, houve um aumento desses açúcares devido, provavelmente, à degradação dos carboidratos de reserva “efeito Pasteur”. Portanto, os açúcares solúveis são particularmente importantes fontes de energia para o metabolismo fermentativo, em condições de baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> (Drew, 1997; Visser et al., 2003).

Entretanto, Kennedy et al. (1992) mencionam que a capacidade respiratória da raiz em plantas submersas apresenta-se como um indicador da viabilidade do sistema radicular ou integridade do aparato respiratório. Contudo, Gardiner & Krauss (2001) não verificaram alterações na respiração em plantas de *Quercus pagoda* mantidas sob alta e baixa intensidade de luz e no escuro em plantas em condições de submersão do sistema radicular por 30 dias.

#### **2.4 Conseqüências da hipoxia e anoxia sobre metabolismo do nitrogênio**

A redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é catalisada pela enzima redutase do nitrato, sendo considerada uma importante etapa limitante na assimilação de nitrogênio

(Naik et al., 1982). O metabolismo do nitrogênio e o suprimento exógeno de nitrato podem ser importantes na tolerância durante a anoxia (Fan et al., 1997; Rawlyer et al., 2002). Alguns autores afirmam que a redutase do nitrato apresenta um papel fundamental, juntamente com as vias fermentativas alcoólica e láctica, assim como a síntese de lipídeos, na oxidação do NADH, durante a baixa disponibilidade de oxigênio. A oxidação do NADH é essencial para a continuidade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e fluxo do carbono para regeneração de ATP.

A manutenção da redução do nitrato a amônio e subsequente re-assimilação deste apresentam-se como uma fonte extra de seis prótons e quatro  $\text{NAD}^+$  por ciclo de reação durante a anoxia (Naik et al., 1982).

Segundo Drew (1997), o nitrato é considerado um aceptor alternativo de elétrons conhecido como a “respiração do nitrato” durante a anoxia. Esta respiração tem sido sugerida como uma via de produção de ATP e regeneração do  $\text{NAD}^+$  e citoplasmático. Dordas et al. (2003) verificaram que um tipo específico de hemoglobina (fitoglobinas) apresenta a função de regenerar  $\text{NAD}^+$  visando manter a carga energética da célula em condições de hipoxia. Saglio et al. (1988) indicam que a redutase do nitrato não compete efetivamente com a enzima álcool desidrogenase pelo NADH, no entanto, contribui para o metabolismo energético durante a respiração anaeróbica em tecidos por meio da redução do nitrato.

Reggiani et al. (1985) interpretaram que a presença do nitrato exógeno induz a redução do nitrato em raízes de arroz sob condição de ausência de oxigênio, verificando uma elevação no consumo de carboidratos, proporcionando um aumento na carga energética do adenilato, condição esta favorável à atividade fermentativa.

Fox et al. (1994), trabalhando com *Echinochloa phyllopogon*, verificaram que a operação conjunta da fermentação e da atividade do ciclo de

Krebs compensa o requerimento de energia durante o crescimento anaeróbico. Estes autores também constataram nesta espécie, quando submetida à anaerobiose, que as atividades *in vitro* da redutase do nitrato e do nitrito não variaram e que a redução do nitrato oxidou apenas 34% do NAD(P)H produzido diariamente.

Reggiani et al. (1988) sugeriram que o aumento na concentração de aminoácidos livres sob condições de anaerobiose é decorrente da degradação das proteínas e mudanças no metabolismo dos ácidos orgânicos. Souza et al. (2001b), verificaram que o decréscimo na atividade *in vivo* da redutase do nitrato em algodoeiro está relacionado com o acúmulo de aminoácidos e peptídeos, que são reservas temporárias de nitrogênio.

Fan et al. (1997), trabalhando com arroz, que é uma espécie tolerante à submersão total ou parcial, verificaram que a assimilação de nitrato e íons amônio da solução e incorporação de N em aminoácidos (especialmente glutamina e alanina) aumentam em condições anaeróbicas. Isto sugere que a assimilação contínua de nitrogênio mantém o fluxo de elétrons e o decréscimo de NADH, favorecendo a fermentação etanólica. Por outro lado, Nabben (2001), trabalhando em condições de submersão total com espécies de *Rumex* constatou uma baixa atividade da redutase do nitrato nos tecidos, sugerindo que a assimilação do nitrato não é uma importante via metabólica alternativa para produzir energia. Comportamento similar foi observado em gramíneas (Ishida, 1998) e ingazeiro (Botelho, 1996).

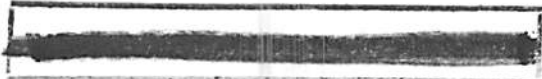
## **2.5 Conseqüências da hipoxia e anoxia na morfologia e anatomia vegetal**

Algumas plantas, quando sujeitas à submersão, apresentam estratégias adaptativas (Andrade et al., 1999). A principal delas consiste em reduzir o período de submersão, por meio de um aumento na taxa de alongação da parte

aérea para proporcionar o contato com o ar (Visser et al., 2003). Em gramíneas, o crescimento basal das folhas submersas permitiu o acesso ao oxigênio do ar e a maior tolerância à submersão (Dias-Filho & Carvalho, 2000). Quando apenas parte das plantas é submersa, o oxigênio pode entrar através das folhas. No caso de submersão total, é impossível que aconteça entrada de oxigênio atmosférico, embora esta condição requeira diferentes modos de adaptação à deficiência de oxigênio.

As plantas em condições de submersão parcial desenvolvem estruturas morfológicas especializadas, tais como a formação de lenticelas, hipertrofia de aerênquimas, de raízes laterais. Essas estruturas, além de promover a oxigenação interna, também permitem a difusão na rizosfera (Joly & Crawford, 1991; Pelacani, 1992; Blom et al., 1994; Yamamoto et al., 1995; Pezeshki et al., 1996; Núñez-Elisea et al., 1999; Chen et al., 2002 e Visser et al., 2003). Da mesma forma, Yoshida & Eguchi (1994) concluem que o O<sub>2</sub> atmosférico pode ser transportado das folhas pelos espaços intracelulares das células para a respiração das raízes, crescendo sob deficiência de O<sub>2</sub>. Segundo Laan et al. (1990), o transporte de oxigênio longitudinal interno pode ser considerado importante para a manutenção da aerobiose no sistema radicular em condições de hipoxia.

Pelacani (1992) e Botelho (1996) verificaram a formação de raízes adventícias na porção basal do caule em plantas de ingazeiro mantidas sob inundação do sistema radicular. Pelacani (1992), trabalhando em condições de submersão do sistema radicular verificou redução no particionamento da biomassa em todas as espécies estudadas, exceto para as plantas de açaí (*Euterpe oleracea*), enquanto que as plantas de ingazeiro apresentaram, em média, a maior redução de biomassa seca de 71% em relação ao controle. Blom et al. (1994) verificaram que plantas de *Rumex crispus* apresentaram melhor resposta adaptativa à submersão total do que outras espécies por eles estudadas, em



contraste com *Daucus carota*, *Arrhenatherum elatius* e *Pantago lanceolata* que são extremamente sensíveis à injúria por submersão.

## 2.6 Resposta à normoxia de plantas pós-submersas

Após o retorno às condições normais de  $O_2$ , a adaptação das plantas se dá por meio de oxidação de metabólitos que foram acumulados durante a ausência de oxigênio, os quais são potencialmente danosos. Esses efeitos deletérios são usualmente atribuídos a espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), o ânion superóxido ( $O_2^\cdot^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que são formados nos compartimentos celulares, incluindo parede celular (Blokina et al., 1999 e Rawyler et al., 2002). Proteções contra espécies reativas de oxigênio após a submersão são determinadas pelo mecanismo de defesa antioxidante (ascorbato, glutatona ou alfa-tocoferol) ou enzimas (catalase, peroxidase ou superóxido dismutase) que eliminam os radicais livres. (Drew, 1997; Biemelt, 1998; Blokina et al., 1999 e Ahmed et al., 2002). Segundo Blokhina (2000), os radicais livres causam peroxidação em lipídios de membrana, decréscimo de glutatona reduzida, aumento na concentração de cálcio citossólico, oxidação de grupos tiol das proteínas e despolarização de membranas.

Injúrias causadas à planta pela retomada dos níveis normais de  $O_2$ , decorrentes do baixo suprimento de energia, favorecem a geração de espécies reativas de oxigênio, ocorrendo a formação de radicais livres poucos minutos após o restabelecimento do nível de oxigênio (Blokhina, 2000). Entretanto, Ahmed et al. (2002) sugerem que o estresse oxidativo não está diretamente envolvido no mecanismo de perda fotossintética durante a submersão parcial em plantas feijão.



Por todas essas razões, a habilidade das espécies em tolerar ambiente de limitação de O<sub>2</sub> é considerada um fator essencial para prolongar a sobrevivência à submersão (Vervuren et al., 1999; Rascio, 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Época e localização do experimento

Este trabalho foi conduzido no período de outubro de 2002 a janeiro de 2003, na área experimental do setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais.

#### 3.2 Material vegetal e sistema de cultivo

Plantas de ingá (*Inga vera* Willd.) com três meses de idade foram obtidas no viveiro florestal da UFLA, provenientes de sementes coletadas às margens da matas ciliares do alto Rio Grande, MG. Essas plantas permaneceram em tubetes plásticos em casa de vegetação durante mais uma semana, cobertas por uma malha de plástico que interceptava 30% da radiação solar incidente. As plantas foram previamente selecionadas com base na uniformidade, altura e estado fitossanitário. Após esse período, as mudas foram transplantadas e agrupadas em conjunto de quatro plantas por vaso, com capacidade de 3,0 litros. Foi utilizada areia previamente lavada com água de torneira em abundância, com o intuito de se retirar toda a matéria orgânica. Ao término do transplante das mudas para os vasos, foi adicionado 1,5 L de solução nutritiva Bolle-Jones (1959), adaptada por Delú Filho (1994) e modificada por Lemos (1996). A solução apresentava pH 6,5 com a seguinte composição e suas respectivas concentrações: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (4 mmol L<sup>-1</sup>), CaSO<sub>4</sub> (1 mmol L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (1,25 mmol L<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mmol L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 mmol L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,5 mmol L<sup>-1</sup>),

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (25 μmol L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub> (5 μmol L<sup>-1</sup>), Fe-EDTA (20 μmol L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,5 μmol L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub> (2 μmol. L<sup>-1</sup>) e ZnSO<sub>4</sub> (2μmol. L<sup>-1</sup>). Apenas 1,15 L de solução nutritiva ficava retido pelo substrato e 0,35 L excedente era coletado em um prato colocado sob cada vaso, cujo volume era completado diariamente com água de torneira.

### **3.3 Tratamento e avaliações**

Após o estabelecimento das plantas, foram aplicados dois tratamentos. Um grupo foi submetido a condições de submersão total e o outro mantido sob condições de cultivo sem a submersão citada anteriormente.

As plantas foram transferidas para tanques de alvenaria com 3 metros de comprimento, 1 metro de largura e 0,6 metro de profundidade, com capacidade para 1.800 litros, cobertos com uma malha de plástico que interceptava 30% da radiação. Para simular a condição de baixa disponibilidade de oxigênio (BDO), foram adicionado 40 litros da mesma solução nutritiva citada anteriormente em 1.500 L de água de torneira previamente contidos no tanque. Foram adicionados também ao tanque 18 mL de algicida comercial à base de cobre somente no início do experimento para prevenir a formação de algas. Foram mensurados os níveis de O<sub>2</sub> na solução nutritiva do tanque e dentro dos vasos.

A profundidade do volume da solução nutritiva no tanque foi fixada em torno de 40 cm, para manter as folhas completamente submersas e sem o contato com o ar. Plantas não submersas foram mantidas nas mesmas condições que estavam sendo cultivadas durante o período de aclimação. Durante a condução do experimento, os nutrientes não foram repostos.

As avaliações foram realizadas aos 0, 3, 7, 15, 50, 75, 80, 85 e 90 dias após indução dos tratamentos (DAIT), nos quais foram realizadas coletas de material vegetal para as determinações da fotossíntese potencial e teor de

clorofilas e nos dias 0, 3, 7, 15, 75, e 85 foram coletadas plantas de cada parcela experimental, que foram separadas em folha e raiz, para a determinação da atividade da redutase do nitrato (RN; E.C. 1.6.6.1) “*in vivo*” e concomitantemente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -20°C até o momento da realização das determinações das atividades das enzimas: sintase do glutamato (NADH-GOGAT; 1.4.1.14), desidrogenase alcoólica (ADH; EC. 1.1.1.1), desidrogenase láctica (LDH; 1.1.1.27), teores de carboidratos solúveis totais e redutores, proteínas e aminoácidos. Para minimizar os efeitos do ritmo diurno nas variáveis mensuradas, as plantas foram sempre coletadas ou avaliadas entre o intervalo de 9 h e 11 h do horário solar.

Transcorridos 75 DAIT, dois grupos de plantas foram retirados da submersão; o primeiro destinou-se à análise morfológica (anatômica) e biométrica. Neste caso, quatro plantas de cada tratamento foram separadas em partes aéreas e raízes, procedendo-se a determinação do volume radicular, altura e área foliar. Após isso, as amostras foram secas em estufa com circulação forçada de ar (48h, 65°C) e o peso da matéria seca foi determinado. Outro grupo de plantas foi utilizado para a avaliação da recuperação pós-submersão. As plantas foram mantidas em condições drenadas e irrigadas com a mesma solução nutritiva do tanque, tendo sido quantificadas as trocas gasosas, fotossíntese potencial e teor de clorofila. A capacidade de sobrevivência das plantas logo após a submersão foi avaliada baseando-se em observações visuais acerca de sua aparência física, tais como: plantas com folhas verdes e túrgidas, além do bulbo apical verde. Ao final de 15 dias após o período de submersão, verificou-se a ocorrência de novos lançamentos foliares, como indicador da capacidade de recuperação das plantas. Avaliaram-se, nos tempos 0, 5 e 10 dias após o período de submersão (DAS), a fotossíntese líquida e 0, 5, 10 e 15 DAS, a fotossíntese potencial e teores de clorofilas.

### **3.4 Delineamento experimental e análises estatísticas**

O experimento foi conduzido no delineamento de blocos casualizados com dois tratamentos, sem submersão e com submersão total das plantas, quatro repetições e considerando que cada duas plantas consistiram na unidade experimental. Os dados foram obtidos levando-se em conta os erros padrões das médias dependendo das características avaliadas.

### **3.5 Características avaliadas**

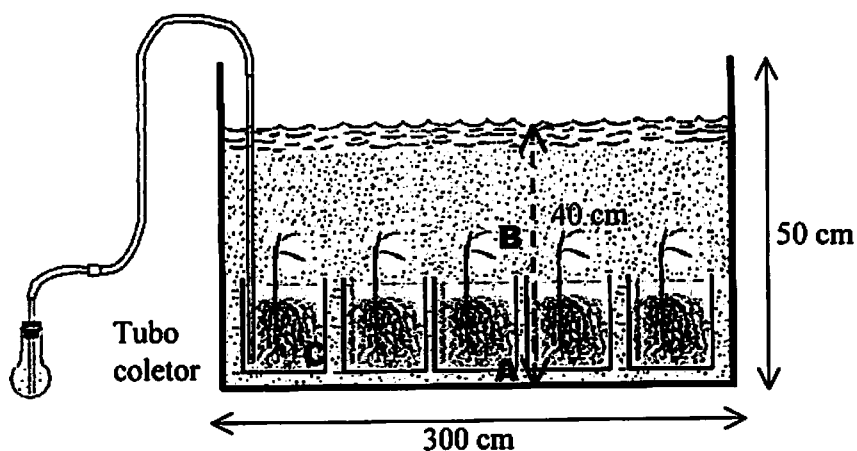
#### **3.5.1 Caracterização do ambiente**

O experimento foi conduzido em área localizada em latitude 21° 14' S, longitude de 45° 00' W, numa altitude de 910 metros. Durante o período experimental foram monitoradas condições ambientais, tais como temperaturas máxima e mínima, precipitação, insolação e umidade relativa do ar. Estes dados foram obtidos junto à Estação Climatológica Principal de Lavras, Minas Gerais, a qual está situada a cerca de 300 metros da área experimental.

A caracterização da radiação global em diferentes alturas de lâmina d'água foi quantificada utilizando um Datalogger-LI-COR (LI 1400) ao qual foram conectados sensores revestidos com filme de polietileno impermeável e transparente. Tais sensores foram posicionados a 40 e 20cm de profundidade no tanque e na superfície da lâmina de água após submersão das plantas, como se observa na Figura 1. A avaliação foi realizada em dia típico (sem nuvens). Os valores instantâneos foram registrados com média de 4 repetições, no período de 11 h às 11 h 15 min (horário solar).

4 Blocos

### 3.5.2 Croqui ilustrativo do tanque de submersão



**FIGURA 1:** Esquema representativo da profundidade dos pontos de coletas de água dentro do tanque e do vaso. Fundo do tanque a 40 cm (A), no meio a 20 cm (B) e dentro do vaso a 30 cm da superfície da lâmina d'água (C).

A concentração de oxigênio dissolvido foi determinada pelo método de Winkler (Apha, 1998), conforme ilustra a Figura 1. O qual considera que a quantidade de  $O_2$  dissolvido na água considerada 100% saturada corresponde a concentração de  $9.1 \text{ mg/L}^{-1} O_2$  dissolvido. As amostras de água foram coletadas do fundo do tanque, ao lado dos vasos (A), a 20 cm da superfície da lâmina d'água (B) e dentro do vaso (C), utilizando frasco para análises de baixa disponibilidade de oxigênio (BDO) 300 mL. As amostras foram coletadas por sifonação para os frascos e, imediatamente, o oxigênio era quantificado. Adicionaram-se ao frasco 2 mL de sulfato manganoso ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) e 2 mL de reagente alcali-iodeto-azida. Após a formação de um precipitado, 5 minutos aproximadamente, adicionam-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, mediram-se 100 mL da solução em erlenmeyer (250ml) e titulou-se, com auxílio de uma

bureta, uma solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,0125 N até a viragem para incolor. O volume gasto com a titulação correspondia à quantidade de oxigênio dissolvido na água em mg de  $\text{O}_2/\text{L}$ .

### 3.5.3 Fotossíntese potencial ( $A_{max}$ )

A fotossíntese potencial foi determinada pelo método de evolução do oxigênio, usando uma câmara de Clark de fase gasosa, marca Hansatech, e um eletrodo de oxigênio acoplado a uma caixa de controle de fluxo elétrico CB1 Hansatech, que amplifica as correntes vindas do eletrodo, seguindo a metodologia de utilizada por Delieu & Walker (1983), com as seguintes alterações: solução de KCl saturada e  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). As determinações foram realizadas à temperatura constante de  $35^\circ\text{C}$ . A determinação do volume da câmara foi determinada usando o método de injeção (Delieu & Walker, 1981). A iluminação da câmara foi realizada utilizando-se um retroprojektor que fornecia aproximadamente  $1600 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), medida por um quantômetro Hansatech na superfície superior da câmara. Folhas do tratamento com submersão foram coletadas e transportadas imediatamente na mesma solução nutritiva para o laboratório, para minimizar possíveis danos de re-exposição ao ar atmosférico, até o momento das medições, sendo utilizadas amostras de quatro discos foliares de  $10 \text{ cm}^2$ .

A curva de  $A_{max}$  versus DFFFA foi determinada da mesma forma como descrito acima, exceto na série de DFFFA que variou de 1600, 900, 300, 100 e  $0 \mu\text{moles m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  os quais foram obtidos variando o ângulo de reflexão da fonte de luz do retroprojektor.

### **3.5.4 Trocas gasosas**

Somente após 1 hora do início do período de recuperação, foram avaliadas as seguintes características: densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA), taxa fotossintética líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e temperatura foliar ( $t_f^{\circ}\text{C}$ ). As avaliações foram realizadas nos seguintes tempos: 0, 5 e 10 DAPR nas plantas em recuperação pós submersão e nas não submersas, em folhas completamente expandidas. Para estas avaliações, utilizou-se o analisador de gás infravermelho (IRGA), sistema aberto, portátil, modelo ADC-LCA-4 (Hoddesdon, UK). No geral, as avaliações foram realizadas às 10 h (horário solar), utilizando quatro plantas por tratamento.

### **3.5.5 Análises químicas**

#### **3.5.5.1 Quantificação de clorofilas**

Os teores de clorofilas a, b, total e a relação a/b foram avaliadas em extratos obtidos após maceração de discos foliares de 0,1 g de biomassa fresca (BF) retirados da mesma folha utilizada para a análise da fotossíntese potencial. As amostras foram colocadas em almofariz com 3 mL de acetona (80%) e completando-se até 8 mL, centrifugando-os a 10.000g por 20 minutos, em sala mantida apenas com fonte de luz verde. Retirou-se 1 mL do sobrenadante que foi diluído em acetona 80% na cubeta para 3 mL e feita as leituras nas absorbâncias a 663nm e 645nm, para clorofila a e b, respectivamente, segundo (Holden, 1976), utilizando-se espectrofotômetro DU 640B, Beckman, USA. Utilizaram-se as seguintes equações para determinar o teor das clorofilas:

$$\text{Clorofila a} = 12,7 \cdot A_{663\text{nm}} - 2,69 \cdot A_{645\text{nm}}$$



Clorofila b = 22,9 . A645nm - 4,28 . A663nm

Clorofila total = 8,02 . A663nm + 20,2 . A645nm

### 3.5.5.2 Atividade da redutase do nitrato

A atividade da redutase do nitrato “in vivo” foi determinada nas raízes e lâminas foliares. Pesaram-se 500 mg de amostras em solução tampão fosfato de potássio 50 mmol/L e pH 7,5, transferindo-as para becker de 20mL contendo 5 mL de um meio de incubação, composto de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L e pH 7,5 (4,95 mL), n-propanol a 1% (v/v) e KNO<sub>3</sub> a 0,1 mol/L. Estas amostras foram infiltradas a vácuo por 2 minutos e, em seguida, os recipientes foram submetidos a banho-maria com agitação a 30°C, por 30 minutos de incubação. Foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do extrato e colocadas em meio de reação composto de 1 mL de sulfanilamida a 1% em HCl 1,5N, 1 mL de N-2-naftil etileno 0,02%, completando-se o volume para 4mL com água destilada. As leituras das absorbâncias foram realizadas no comprimento de 540nm, sendo a atividade da enzima expressa em  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 3.5.5.3 Extrações e análises químicas

#### 3.5.5.3.1 Preparo do material

As análises bioquímicas foram realizadas em extratos de lâminas foliares sem a nervura central e raízes previamente lavadas em água destilada. As folhas utilizadas foram as mesmas selecionadas para as avaliações fotossintéticas (fotossíntese potencial). Este material, após a coleta, foi acondicionado em sacos plásticos, colocado em caixa de isopor com gelo e transportado até o laboratório, onde se seguiram os processos de retirada da

nervura central, fragmentação e pesagem das lâminas foliares. Os tecidos da raiz, após a coleta, também foram transportados até o laboratório, onde foram realizados os processos de fragmentação e pesagem.

Os diferentes tecidos foram pesados em amostras de 500 mg, colocados em papel alumínio, congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenado em freezer de -86 °C até o momento das análises.

As etapas de extração e quantificação das enzimas foram realizadas segundo metodologia utilizada por Tribuzy (1998).

### **3.5.5.3.2 Obtenção dos extratos e ensaios enzimáticos**

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos segundo metodologia descrita e utilizada por Trybuzi (1998), pela maceração de 1,0 g das amostras de tecido vegetal em nitrogênio líquido, seguida da adição de 5mL de um meio de extração composto de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 7,5, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,5 mol/L, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mol/L, DTT 1,0 mol/L, PMSF 0,4 mol/L e PVPP (100 mg). Seguiu-se uma centrifugação a 30.000 g durante 10 minutos a 4°C. As temperaturas de todos os equipamentos e soluções utilizadas durante a realização dos ensaios foram mantidas próximas de 4 °C.

Os extratos obtidos foram mantidos em banho de gelo até serem utilizados para os ensaios enzimáticos da desidrogenase alcoólica, desidrogenase láctica e sintase glutamato dependente da NADH. Os açúcares redutores, açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos totais também foram quantificados utilizando-se este mesmo extrato.

#### **3.5.5.3.2.1 Desidrogenase alcoólica**

Para o ensaio da ADH, foram adicionados 100 µL do extrato enzimático

em 2,7 mL do meio de reação composto de tampão Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,9, DDT 2 mmol/L, 100  $\mu$ L de etanol 96%, 100  $\mu$ L de  $\beta$ NAD<sup>+</sup> 7,5 mmol/L, foi incubado durante 15 minutos a 30°C e NADH foi determinado em espectrofotômetro 340 nm, no sentido da oxidação do etanol, durante 3 minutos.

#### **3.5.5.3.2.2 Desidrogenase láctica**


Para o ensaio da LDH, foram adicionados 100  $\mu$ L do extrato enzimático em 2,7 mL do meio de reação composto de tampão Tris HCl 50 mmol/L pH 8,9, glicina 0,1 mmol/L, sulfato de hidrazida 100 mmol/L, 0,1  $\mu$ L de lactato de sódio, 100  $\mu$ L de NAD<sup>+</sup> 7,5mmol/L. Foi incubado durante 15 minutos a 30° C. O NADH formado foi determinado em espectrofotômetro a 340 nm, no sentido de oxidação do lactato, durante 3 minutos.

#### **3.5.5.3.2.3 Sintase do glutamato dependente da NADH**

Para o ensaio da NADH-GOGAT, 100  $\mu$ L do extrato enzimático obtido foram adicionados a 800  $\mu$ L de um meio contendo tampão fosfato pH 7,5 0,5 mol/L, 15 mmol/L de glutamina, 15 mmol/L de 2-oxoglutarato, 10 mN KCl e 20 mmol/L de 2- $\beta$ -mercaptoetanol. Todo esse conjunto foi pré-incubado por 3 minutos a 30°C e, na seqüência, foi adicionado 0,1 mmol/L de NADH, seguido do monitoramento da oxidação do poder redutor durante 10 minutos a 340 nm. A atividade enzimática foi expressa em  $\eta$ moles GLU. g<sup>-1</sup>MF. min.<sup>-1</sup>.

#### **3.5.5.3.2.4 Açúcares solúveis totais**

O teor de açúcares solúveis totais foi dosado segundo a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954). Para tanto, adicionaram-se 100  $\mu$ L do



extrato em 900  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2 mL do reagente antrona, composto de 20 mg de antrona, 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Após agitação, os tubos foram levados para aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ , por 5 minutos. A quantificação dos açúcares solúveis foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm, baseada na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose e expressos em  $\mu\text{mole de Glc.g}^{-1}\text{MF}$

#### **3.5.5.3.2.5 Açúcares redutores**

A metodologia utilizada para a quantificação dos açúcares redutores foi a descrita por Miller (1959), em que se utiliza o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para a oxidação destes compostos. A alíquota utilizada foi de 100  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, sendo adicionados 1400  $\mu\text{L}$  de água destilada e 1000  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada e levada ao banho-maria por 5 minutos, a  $100^\circ\text{C}$ , sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. A quantificação dos açúcares redutores foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm, baseada na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose e expressos em  $\mu\text{mol Glc.g}^{-1}\text{MF}$ .

#### **3.5.5.3.2.6 Proteínas**

A determinação de proteínas ocorreu pelo método de Bradford (1976) nos mesmos extratos brutos utilizados nos ensaios enzimáticos. As alíquotas foram de 300  $\mu\text{L}$  dos extratos e 1 mL do reagente Comassie, constituído de 0,01% de Comassie Blue G-250, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. O volume do reagente Comassie foi reduzido em 50% tanto na quantificação das proteínas como na elaboração da curva padrão. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex e levadas para leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

Os valores foram calculados com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA) e expressos em mg BSA.g<sup>-1</sup> MF.

#### **3.5.5.3.2.7 Aminoácidos**

A determinação dos aminoácidos foi realizada pelo método de Yemm & Cocking (1955). Em alíquotas de 0,3 ml foi adicionado 1,7 ml do reagente composto por 0,5 ml de tampão citrato de sódio (0,2 mmol/L e pH=5,0), 0,2 mL do reagente de ninhidrina e 1,0 ml de KCN (2% em metilcelossolve). Após 20 minutos em banho-maria a 100°C, foi adicionado 1,3 ml de etanol (60%) e lidas a 570 nm. Os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicina e expressos em µmol Gly. g<sup>-1</sup>MF.

### **3.6 Características morfológicas e biométricas**

As plantas, ao final de 75 DAIT, foram seccionadas em parte aérea, caule e raiz, realizando-se as seguintes avaliações: altura da parte aérea foi medida no coleto na altura do vaso até o ápice, com auxílio de uma régua milimetrada; área do folíolo foi obtida utilizando-se o método dos discos foliares, com um perfurador metálico. Volume da raiz foi determinado pelo deslocamento da coluna d'água causado pela imersão das raízes em uma proveta com capacidade de 500 mL, contendo 400 mL de água de torneira. Cada uma das partes foi acondicionada em sacos de papel e levadas para secar em estufa a 65°C com ventilação forçada, após 48 horas, para determinação de biomassa seca.

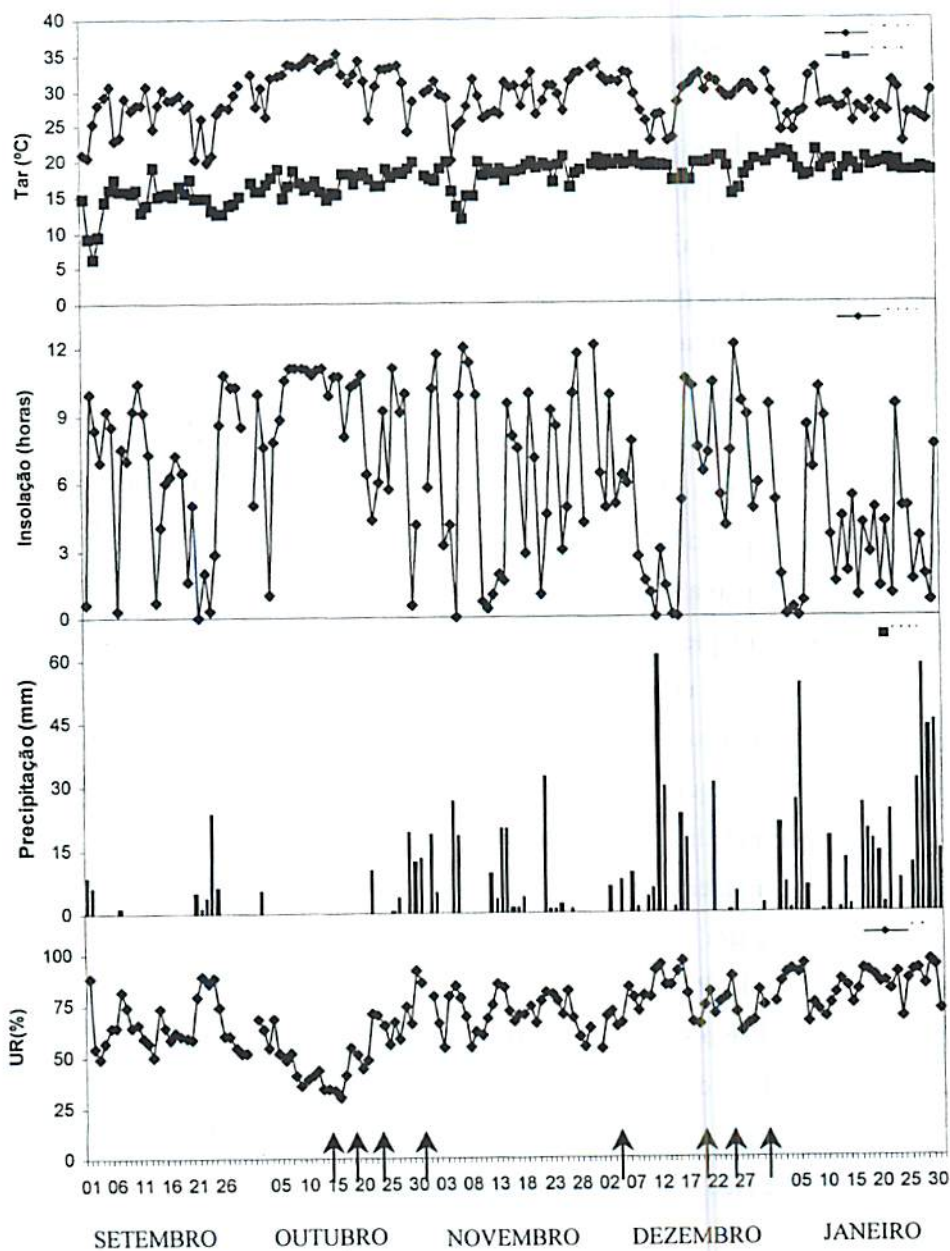
### **3.7 Características anatômicas**

Para o estudo anatômico das raízes foi utilizada microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz<sup>z</sup>-ESALQ (Universidade de São Paulo-USP) com auxílio de um aparelho Zeiss DSM 940 A. O material foi fixado em solução de glutaraldeído e formaldeído a 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,05 mol/L pH 7,5 e cloreto de cálcio 0,001mol/L, pós-fixado em tetroxido de ósmio, desidratado em série alcoólica crescente e secado ao ponto crítico. As amostras foram cobertas com partículas de ouro, montadas e fotomicrografadas.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização do ambiente**

Na Figura 2 encontram-se os dados meteorológicos referentes ao período experimental. Os maiores valores de temperatura máxima do ar foram registrados durante o mês de outubro, enquanto que os menores valores de temperatura foram registrados durante o mês de setembro (Figura 2A). O mês de outubro foi caracterizado como o período de maior insolação (Figura 2B), menor precipitação (Figura 2C) e menor umidade relativa (Figura 2D), que deve ser atribuído à pouca precipitação, apenas 2,05mm. Entretanto, maiores valores de precipitações (5,46 mm) durante o mês de novembro contribuíram para uma maior umidade relativa do ar.

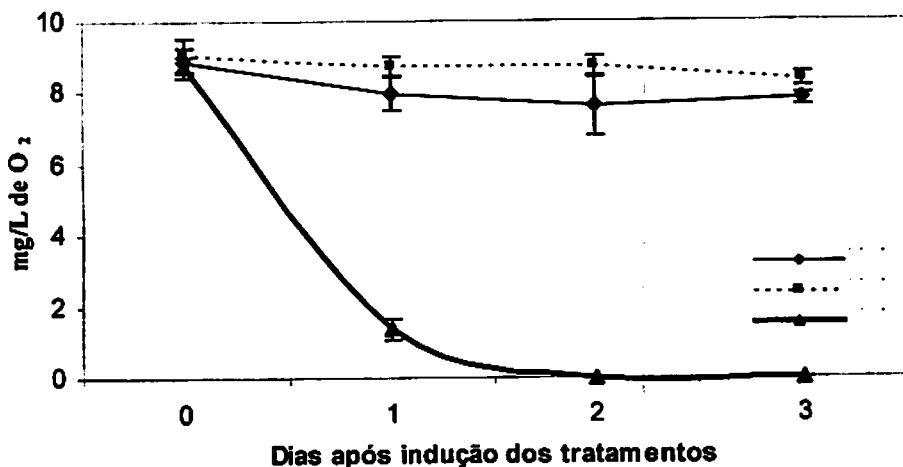


**FIGURA 2:** Temperaturas diárias máximas e mínimas do ar (2A), insolação diária (2B), precipitação diária (2C) e umidade relativa do ar diária (2D) durante o período experimental. As setas correspondem aos dias de avaliação.



#### 4.2 Teores de O<sub>2</sub> dissolvido na solução nutritiva do tanque de submersão

Os valores das concentrações de oxigênio dissolvido na solução nutritiva em diferentes alturas do tanque de submersão (40 e 20 cm e dentro dos vasos com submersão a 30 cm) (Figura 1), em função do tempo, são apresentados na Figura 3. O método foi previamente testado, comparando-se com outro utilizado frequentemente na literatura para promover hipoxia ou anoxia, borbulhamento de nitrogênio gasoso na solução. A concentração do O<sub>2</sub> no interior dos vasos reduziu em torno de 80% ao redor das raízes de ingazeiro, durante o primeiro dia e decresceu a zero (0 mg/L) após o segundo dia de enchimento do tanque. Pôde-se observar duas fases de redução de oxigênio no interior dos vasos: a) 0 - 1 dia, houve um decréscimo abrupto nos teores de O<sub>2</sub> (de 8,9 para 1,2 mg/L); b) 1 - 2 dias, houve uma completa exaustão na concentração de O<sub>2</sub> (de 1,2 para 0 mg/L), o qual pode se tornar um fator limitante à respiração, uma vez que o sistema radicular encontrava-se em plena anoxia; entretanto, a 40 e 20 cm de profundidade no tanque, não houve diferença na concentração de oxigênio durante o período avaliado. A curva de decréscimo de oxigênio dentro do vaso para plantas de ingazeiro em condições totalmente submersas foi semelhante à observada por Souza (2001a), em plantas de soja com o sistema radicular submerso. Segundo Ponnanperuma (1972), o efeito da submersão limita as trocas gasosas entre o solo e a atmosfera ocasionando uma drástica redução na difusão do oxigênio, devido ao consumo de O<sub>2</sub> pelas raízes. Blom et al. (1994) mencionaram que o potencial redox do solo decresce em poucas horas de submersão, indicando uma completa ausência de O<sub>2</sub>.



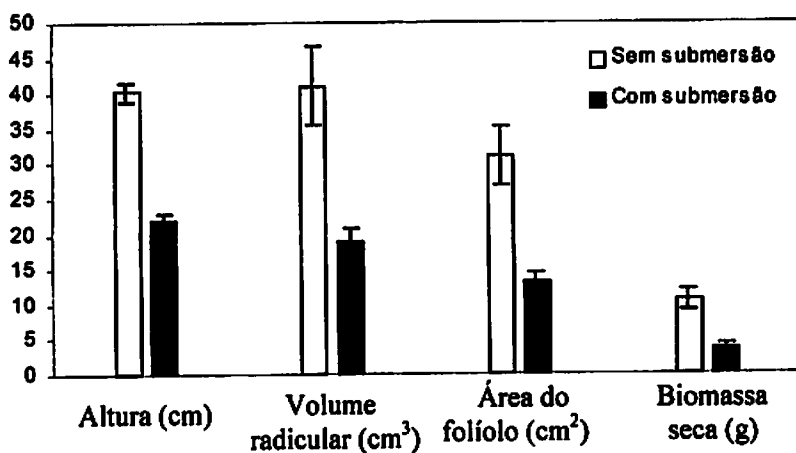
**FIGURA 3:** Teores de  $O_2$  na solução nutritiva a 40 e 20 cm de profundidades no tanque e a 30 cm dentro dos vasos, após submersão das plantas de ingazeiro. As barras indicam o valor de três repetições e o erro padrão da média.

Segundo Ito et al. (1999), durante a fotossíntese e a respiração, gases são produzidos e liberados na água pelas plantas em condições de submersão ( $O_2$  liberado durante o período de radiação solar e  $CO_2$  durante a noite), aumentando a suas concentrações no ambiente. Entretanto, muitos deles também são consumidos ( $O_2$  durante a noite e/ou dia e  $CO_2$  no período do dia) e, devido a isso, decresce a concentração no ambiente de consumo.

#### 4.3 Características morfológicas, biométricas e observações visuais

A submersão total da planta afetou significativamente todas as características avaliadas aos 75 DAIT (Figura 4). A altura, volume radicular, área do folíolo e a biomassa seca corresponderam, ao final do experimento, em 45%, 46%, 44% e 34%, respectivamente, em relação às plantas mantidas sem

submersão. Durante o período experimental foi observado que as plantas submersas de ingazeiro apresentaram nas folhas superiores clorose, escurecimento na região do caule e ramos finos, a partir da segunda semana da indução dos tratamentos, entretanto, não ocorreu crescimento de novas raízes e abscisão foliar. O fato de não existir abscisão foliar pode possibilitar que, depois do período de submersão, ou seja, com o retorno às condições drenadas, essas mesmas folhas possam realizar fotossíntese e retomar o crescimento e o desenvolvimento da planta.



**FIGURA 4:** Altura de planta, volume radicular, área do folíolo e biomassa seca características morfológicas e biométricas de plantas de ingazeiro submetidas à submersão total por 75 dias. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

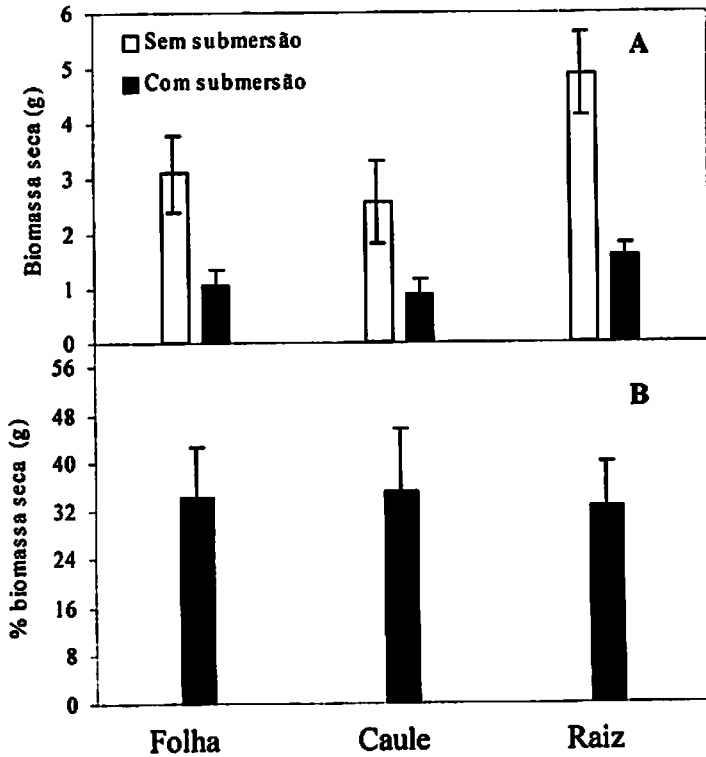
Resultados semelhantes foram anteriormente registrados por Botelho (1996) e Tribuzy (1998), estudando diferentes alturas e tempos de submersão em plantas de ingazeiro, concluindo que o crescimento em condições totalmente submersas foi paralisado.

Pelacani (1992), trabalhando com a mesma espécie com submersão do sistema radicular, observou paralisação no crescimento após 21 dias de submersão. Botelho (1996) sugeriu que a paralisação no crescimento pode ter contribuído para a tolerância à submersão até o final do período experimental e este fator é decorrente, provavelmente, da menor carga energética do metabolismo celular, disponível para os processos de crescimento. Além disso, ocorre inibição da fotossíntese por fatores não estomáticos, que podem envolver mudanças nas enzimas de carboxilação e perda nas concentrações de clorofilas (Kozlowski, 1997). Fox et al. (1994) verificaram que raízes de plantas de *Oryza sativa* e *Echinochloa phyllopagon* em condições de anoxia não apresentaram crescimento. Carvalho & Ishida (2002) trabalhando com plantas jovens de pupunheiras em condições de submersão do sistema radicular, verificaram paralisação no crescimento nas plantas mantidas em condições de anoxia por 21 dias.

Vann & Megonigal (2002) avaliaram plantas de *Taxodium distichum* e *Acer rubrum* em condições de submersão do sistema radicular, com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico. Verificaram que estas concentrações não interferiram no aumento da biomassa, altura da planta e área foliar, indicando que a baixa concentração de O<sub>2</sub> na raiz foi o fator limitante para o crescimento da planta.

O acúmulo da biomassa seca das plantas submersas foi significativamente menor às mantidas sem submersão, tanto na folha, quanto no caule e no sistema radicular (Figuras 5A e 5B). Foi observado que a biomassa da folha, caule e raiz das plantas mantidas em submersão correspondem a aproximadamente 34% de biomassa seca das plantas mantidas sem submersão, ou seja, praticamente ocorreu paralisação no seu crescimento, afetando o acúmulo de biomassa seca nas diferentes partes estudadas quando comparado com plantas mantidas em condições não submersas. Nota-se uma adaptação metabólica para compensar

um ambiente em condições de deficiência de oxigênio. Tal comportamento se assemelha ao encontrado por Ishida (1998) em *Setaria anceps*. Este autor verificou que as plantas paralisavam seu crescimento, enquanto a submersão do sistema radicular mantinha seu crescimento similar às mantidas sem submersão.

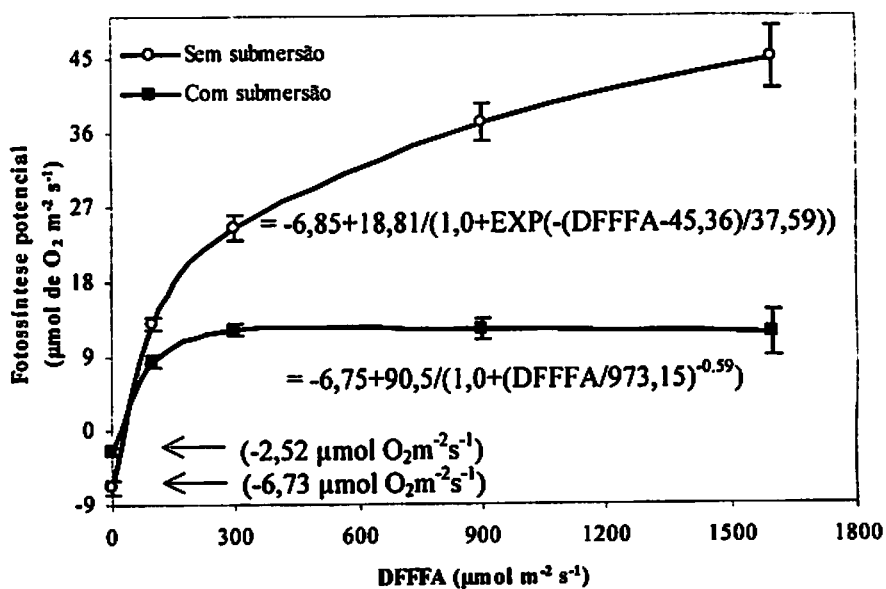


**FIGURA 5:** Biomassa seca (A) e porcentagem em relação ao controle (B) em plantas de ingazeiro, submetidas à submersão total por 75 dias. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

#### 4.4 Resposta da curva de fotossíntese potencial (*A*) versus densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo (*DFFFA*)

Os principais fatores relacionados com a tolerância à submersão em plantas, segundo Vervuren et al. (1999) e Nabben (2001), são: disponibilidade de luz, capacidade fotossintética e capacidade fermentativa dos carboidratos disponíveis. A Figura 6 representa a resposta da curva de *A* versus *DFFFA*, onde não foi observada saturação de luz em  $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para plantas não submersas, enquanto que para plantas submersas a saturação ocorreu entre 100 e  $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Verificou-se também que, em média, a taxa respiratória no escuro em plantas submersas correspondeu a 37% das não submersas, sendo significativamente inferior ( $-2,52 \mu\text{mol de O}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), se comparada com plantas não submersas ( $-6,73 \mu\text{mol de O}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). A baixa taxa respiratória verificada em folhas de plantas de ingazeiro mantidas em condições de submersão total, em relação às folhas sem submersão, indica que há pouco consumo oxigênio. Isto poderia contribuir para um longo período de tolerância à pouca disponibilidade de oxigênio e no meio, decorrente da reduzida solubilidade dos gases no meio líquido, 10.000 vezes menor do que no ar (Vartapetian & Jackson, 1997). Resultados semelhantes foram observados por Vervuren et al. (1999) em folhas de plantas de *Rumex crispus* sob condições de submersão total.

Dessa forma, a capacidade respiratória da raiz em plantas alagadas pode ser considerada um indicador da viabilidade do sistema radicular e integridade do aparato respiratório (Kennedy et al., 1992). Huang & Johnson (1995), trabalhando com trigo, verificaram um decréscimo na taxa respiratória em condições de hipoxia.



**FIGURA 6:** Relação entre fotossíntese potencial versus densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) em folhas de plantas de ingazeiro, ajustadas segundo as equações, nos tratamentos não submersos,  $Lg_{stc}DoseRsp\ y = a + b / [1 + (x / c)^d]$   $r^2 = 0,999078$  e submetido à submersão total, Sigmóide  $y = a + b / \{1 + \exp [-(x - c) / d]\}$   $r^2 = 0,997751$ . Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média. As setas indicam a taxa de respiração no escuro ( $Re$ ).

Uma possível explicação para o menor valor de fotossíntese potencial em plantas em condições de submersão pode estar relacionada com a plasticidade fotossintética em função da baixa disponibilidade de luz (Vervuren et al., 1999; Mauchamp et al., 2001). Isto sugere que a taxa fotossintética se ajusta à quantidade de luz incidente como observado na Tabela 1, onde se verificou que a 20cm e 40cm de profundidade da superfície de lâmina d'água apenas 30% e 15,6% da radiação era interceptada pela folha. Sendo assim, o

principal fator limitante da fotossíntese durante a submersão pode ter sido a luz incidente e não a baixa disponibilidade de O<sub>2</sub> (Vervuren et al., 1999).

A saturação ocorre após 300  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  em plantas submersas, sendo que o requerimento da densidade de fluxo de fótons é menor que em plantas não submersas. Resultados semelhantes foram encontrados por Vervuren et al. (1999) e Gardiner & Krauss (2001), trabalhando com *Rumex crispus* e *Quercus pagoda*, respectivamente.

Os valores referentes à radiação são apresentados na Tabela 1. O sensor foi previamente recoberto com plástico, pois o tipo do sensor utilizado não era indicado para este fim e os valores com o sensor recoberto com plástico eram 15% inferiores aos valores do sensor sem plástico.

**TABELA 1.** Valores de radiação na solução nutritiva a 40 e 20 cm de profundidade no tanque e na superfície da lâmina de água após submersão das plantas.

Profundidade	Radiação solar ( $\text{Wm}^{-2}$ )	(%)
40 cm	109	15,6
20 cm	210	30
0 cm *	503	72
pleno sol	698	100

\* Superfície do tanque

#### 4.5 Fotossíntese potencial e conteúdo de clorofilas

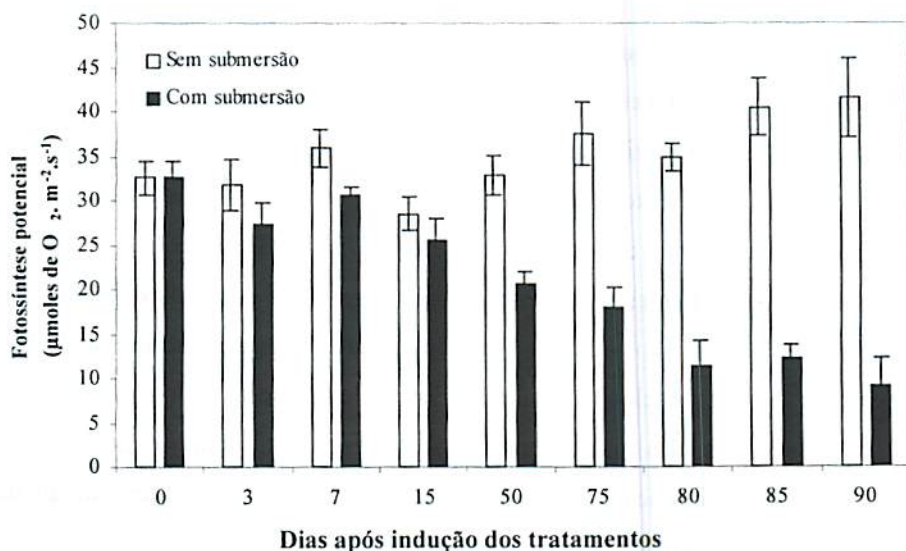
Verifica-se, na Figura 7, que a submersão total afetou significativamente a fotossíntese potencial a partir do 50 DAIT e que, após esse período, decresceu significativamente até os 80 DAIT. Em seguida, a fotossíntese potencial manteve-se constante até os 90 DAIT, quando chegou a



26% em relação às plantas mantidas sem submersão. Nas plantas mantidas sem submersão, foram verificadas pequenas variações na fotossíntese potencial. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por Tribuzy (1998), que trabalhando com ingazeiro em condições similares, verificou que aos 49 dias de submersão total ocorreu redução em torno de 50% em relação às plantas mantidas em condições drenadas.

Uma possível explicação para a redução na fotossíntese potencial observada na Figura 7 seria decorrente de fatores não estomáticos, uma vez que em condições de submersão não há resistência estomática e sim uma barreira física que impede as trocas gasosas com a atmosfera, além da redução no desempenho das enzimas de redução e fixação do CO<sub>2</sub> (Ahmed et al., 2002). Entretanto, provavelmente é decorrente da carência de CO<sub>2</sub> dissolvido na água. Isso porque Vervuren et al. (1999) observaram um aumento na taxa fotossintética em plantas de *Rumex crispus* em condições de submersão total, fornecendo ao meio diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> e fornecendo intensidades de luz normal e baixa (90 e 7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente quando comparadas com plantas nas mesmas condições, exceto pelo período de escuro).

Assim, verifica-se que a redução significativa na fotossíntese baseada na resposta da curva (*A versus DFFFA*) declina a capacidade fotossintética com o aumento na duração da submersão, segundo a Figura 7. Entretanto, Vervuren et al. (1999) associaram o aumento na capacidade fotossintética a um grande aumento na afinidade da enzima de carboxilação pelo CO<sub>2</sub> em plantas de *Rumex crispus* quando submetidas à condição de concentrações de CO<sub>2</sub> elevada.



**FIGURA 7:** Porcentagem da fotossíntese potencial de plantas submersas em relação às não submersas. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

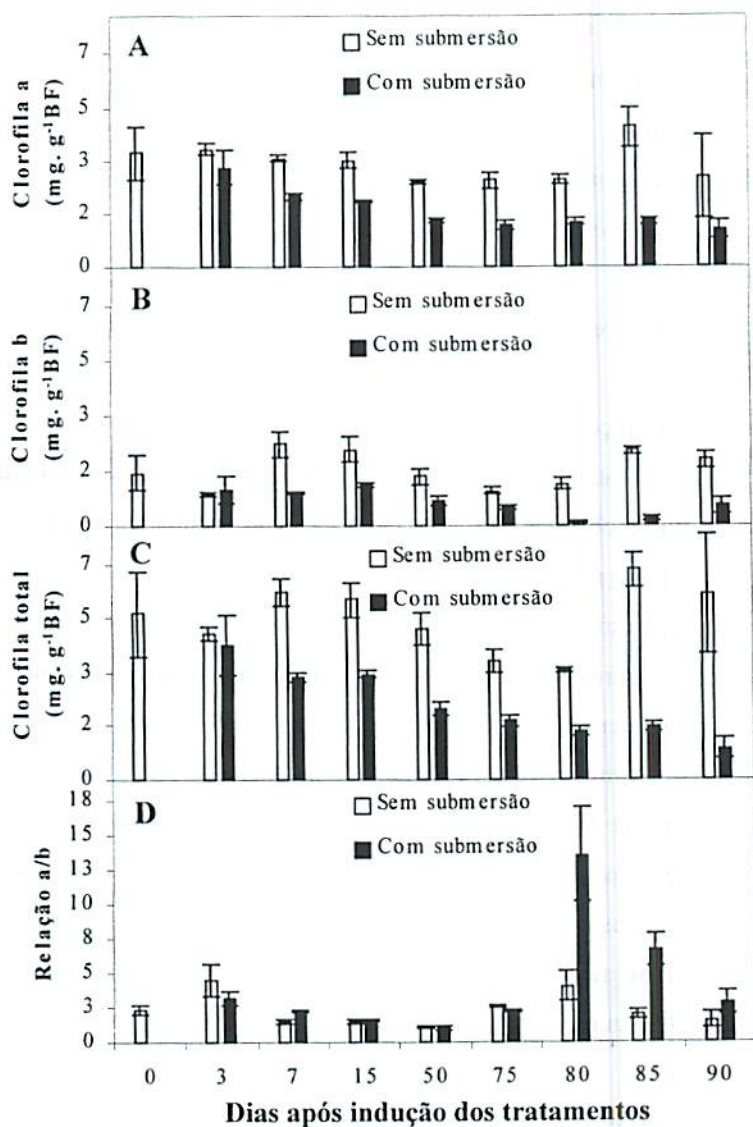
Fernandez et al. (1999) verificaram que folhas de *Psidium ovatifolium* em condições de submersão total no período entre quatro dias e quatro meses apresentavam taxa fotossintética líquida e condutância foliar similar às folhas em condições de não submersão, indicando manutenção da capacidade fotossintética.

Em condições de submersão do sistema radicular, o decréscimo na taxa fotossintética é atribuído geralmente a fatores estomáticos, pois, durante o fechamento estomático, as taxas fotossintéticas são reduzidas pela limitação do CO<sub>2</sub> nos espaços intracelulares da folha, o que é descrito em vários trabalhos (Pezeshki et al., 1996; Gardiner & Krauss et al., 2001; Ahmed et al., 2002 e Carvalho & Ishida, 2002). Concomitantemente com o decréscimo na taxa

fotossintética durante o aumento no tempo de submersão, observa-se, também na Figura 8 que, de maneira geral, o conteúdo de clorofilas *a*, *b* e *total* é significativamente reduzido ( $\alpha=0,05$ ). Contudo, a relação clorofila *a:b* não se altera entre os tratamentos, indicando que os efeitos depressivos da submersão foram semelhantes nas clorofilas *a* e *b* até os 75 DAIT, sugerindo-se que os danos foram semelhantes nos fotossistemas, diferindo a partir de 80 DAIT em condições de submersão total. Ao final de 75 DAIT observou-se que as folhas superiores apresentam clorose, indicando início de senescência dos tecidos.

As folhas das plantas de ingá mostraram-se aptas a manter sua capacidade fotossintética por mais de duas semanas em condições de plena submersão e na presença de luz, como se observa na Figura 6. A relação da clorofila *a/b* não foi alterada neste experimento (Figura 8) e este resultado pode ser considerado como um indicador da tolerância à submersão (Tribuzy, 1998).

Laan et al. (1990) mencionam que a luz apresenta função primária na sobrevivência de plantas submersas, que está relacionada por compensar, por meio da fotossíntese, a deficiência de oxigênio. Vervuren et al. (1999) e Rascio (2002) comentam que provavelmente a fotossíntese das plantas em condições submersas mantenha o ambiente em normoxia durante o período de luz, enquanto à noite verifica-se condição de hipoxia, devido ao fato de atuar apenas o processo de respiração nos tecidos. Summers et al. (2000) também verificaram a redução da taxa fotossintética e conteúdo de clorofilas em condições de submersão total e atribuíram esse fato a uma provável redução na taxa de produção e translocação de produtos fotossintéticos da folha (fonte) para os órgãos drenos (raiz). Ainda segundo esses pesquisadores esta redução é mais acentuada em condições de submersão total, já que os carboidratos de reserva são utilizados para a respiração de manutenção e crescimento na ausência da fotossíntese.



**FIGURA 8:** Teores de clorofilas a (A), b (B), total (C) e a/b (D), em folhas de plantas de ingazeiro. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

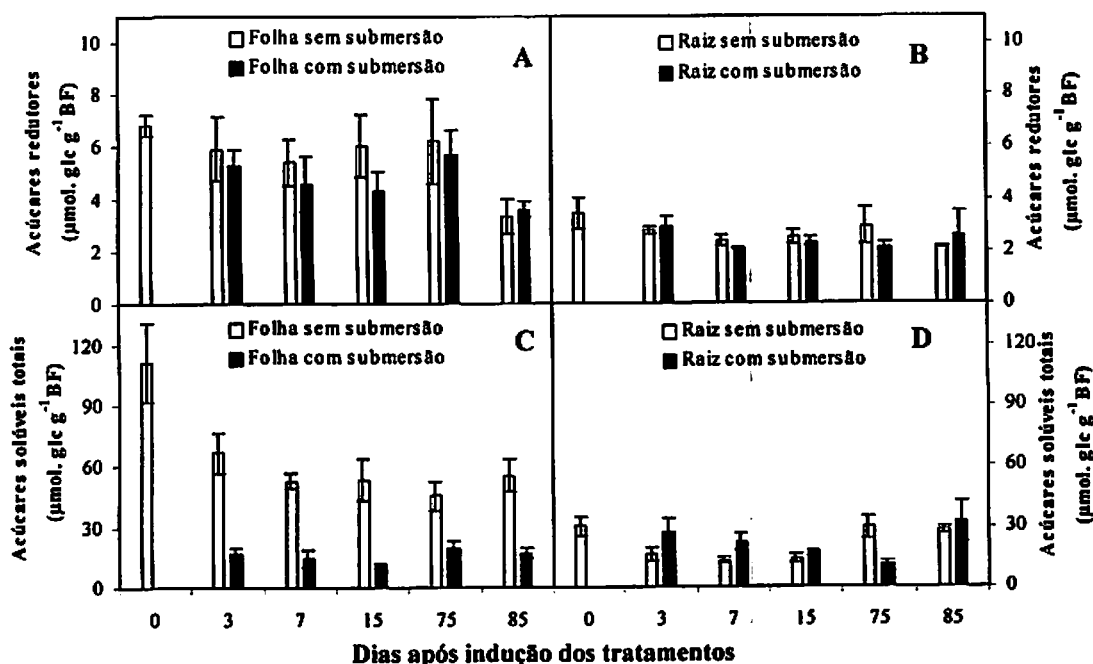
Dessa forma, a redução na fotossíntese e nos teores de clorofilas observados neste trabalho está provavelmente relacionado diretamente aos efeitos da submersão, por meio do impedimento físico da baixa difusão dos gases na lâmina d'água e da qualidade espectral da luz incidente nas plantas, interferindo também no crescimento, como se observa na Figura 4.

#### **4.6 Açúcares redutores, solúveis totais, proteínas e aminoácidos**

As concentrações de açúcares redutores, açúcares solúveis totais em folhas e raízes de plantas de ingazeiro submersas totalmente são apresentados na Figura 9. Não foram observadas diferenças significativas nos teores de açúcares redutores nas folhas e raízes no decorrer do experimento entre plantas submersas e não submersas. Entretanto, observa-se uma maior concentração nas folhas do que nas raízes (Figuras 9A e 9B), provavelmente em função do acúmulo de carboidratos provenientes da fotossíntese. Tribuzy (1998), estudando plantas de ingazeiro em diferentes alturas e tempo de submersão, verificou resultados contrários aos deste trabalho para açúcares redutores, tendo o maior teor ocorrido nas raízes do que nas folhas submersas. Os teores de açúcares redutores foram menores que os açúcares solúveis totais (Figura 9), possivelmente devido ao fato da sacarose ser o principal açúcar não redutor prontamente utilizável pelos vegetais. A Figura 9, inclusive, sugere uma queda muito maior da sacarose do que das hexoses.

Para os teores de açúcares solúveis totais verificaram-se diferenças nas folhas entre os tratamentos, apresentando uma redução abrupta logo no início da submersão (Figuras 9C e 9D). Resultados semelhantes foram obtidos por Tribuzy (1998). No entanto, Botelho (1996), trabalhando com folhas e raízes de plantas ingazeiro, verificou que os teores de açúcares solúveis totais aumentaram ao longo do período experimental. Provavelmente, a redução no teor dos

açúcares totais está associada com a diminuição da fotossíntese, como sugere a Figura 7. Os açúcares totais foram utilizados para compensar o baixo rendimento energético em condições de baixa disponibilidade de O<sub>2</sub>.



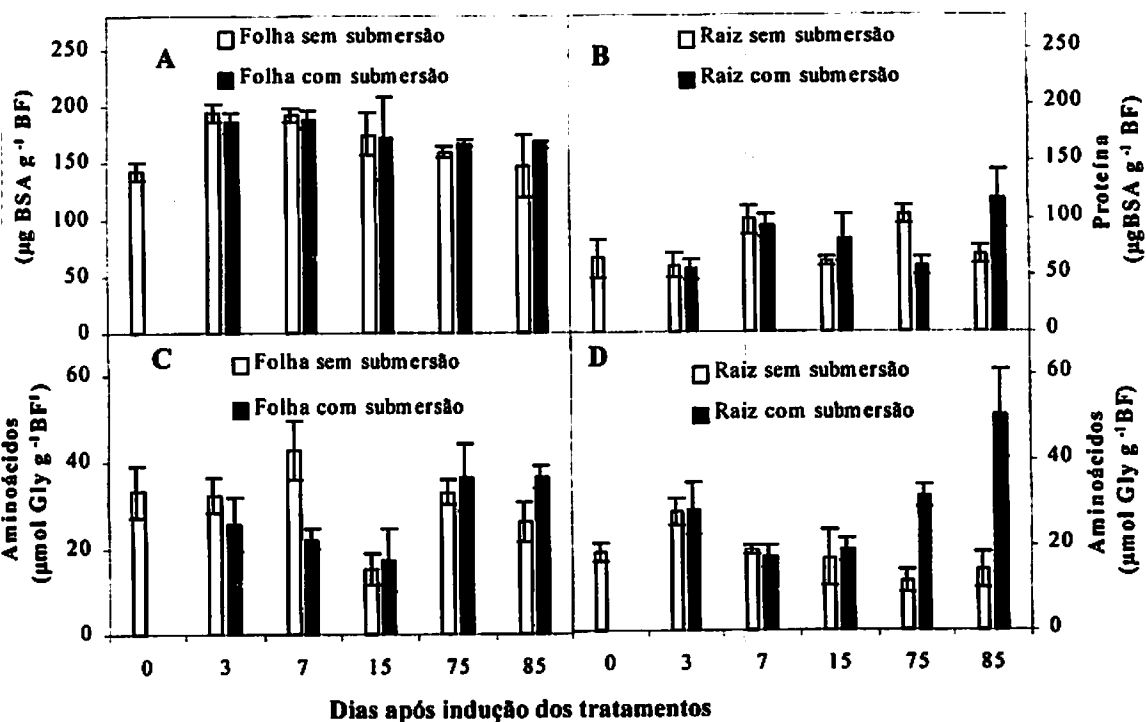
**FIGURA 9:** Teores de açúcares redutores (A e B) e açúcares solúveis totais (C e D) em folhas e raízes de plantas de ingazeiro submersas totalmente. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

Huang & Johnson (1995) e Hsu et al. (1999) verificaram redução na concentração de sacarose foliar, resultante do decréscimo na concentração de açúcares solúveis totais, associado com a redução na fotossíntese em plantas sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

As concentrações de proteínas solúveis totais e aminoácidos nas folhas e raízes das plantas de ingá totalmente submersas são apresentadas na Figura 10.

De maneira geral, o teor de proteínas nas folhas não apresentou diferenças entre os tratamentos durante o período avaliado. Já nas que nas raízes apesar de haver flutuações entre os tratamentos, as respostas não diferiram significativamente da avaliação inicial (Figuras 10A e 10B). Isso provavelmente se deve à degradação de proteínas do metabolismo aeróbico e síntese de proteínas relacionadas com o metabolismo anaeróbico, contrariando Tribuzy (1998) que observou redução progressiva com o decorrer do período de observação. O mesmo autor descreveu que, em condições de campo, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, quando em situação de completa submersão.

Os teores de aminoácidos nas folhas das plantas submersas e não submersas, de maneira geral, não diferiram entre si. Nas raízes, observou-se aumento significativo a partir de 75 dias de submersão. Botelho (1996), trabalhando com a mesma espécie, observou que a submersão total afetou significativamente as raízes das plantas, aumentando o teor de aminoácidos, enquanto que nas folhas não foram observadas diferenças significativas. O aumento observado nos teores de aminoácidos nas folhas 75 DAIT não ocorreu em função da proteólise, pois os valores das concentrações de proteínas foram menores que o tratamento não submerso. Entretanto, aos 85 DAIT verificou-se um aumento na concentração de proteínas e aminoácidos, indicando assim que a síntese dessas proteínas hidrolíticas estaria hidrolizando proteínas não hidrolíticas aumentando assim a concentração de aminoácidos (Figura 10B).



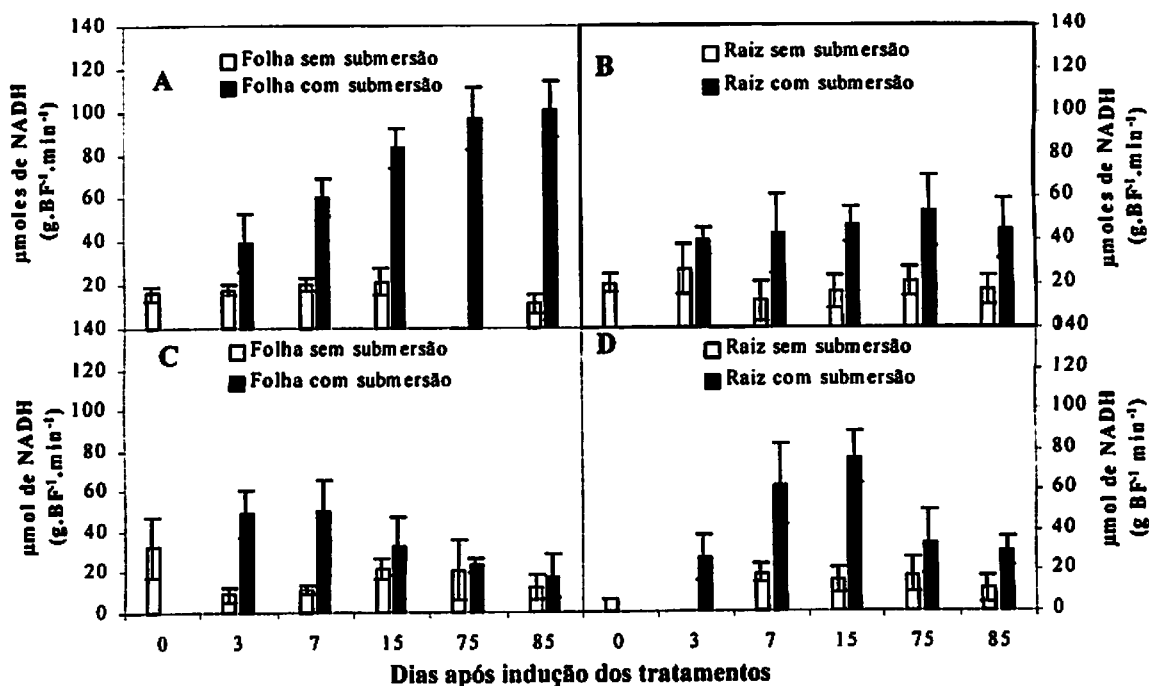
**FIGURA 10:** Teores de proteínas (A e B) e aminoácidos (C e D) em plantas de ingá, submersas e não submersas, durante a submersão total. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

Ishida (1998) e Hsu et al. (1999), trabalhando com diferentes espécies *Setaria anceps* e macieiras, respectivamente, verificaram redução significativa nos teores de proteínas e aminoácidos sob condições de submersão total, semelhante aos resultados encontrados nesse trabalho.



#### 4.7 Atividade das enzimas desidrogenase alcoólica e desidrogenase láctica

Os resultados das atividades das enzimas desidrogenase alcoólica (ADH) e desidrogenase láctica (LDH) em extratos de tecidos de raiz e folha são apresentados na Figura 11.



**FIGURA 11:** Atividade da enzima desidrogenase alcoólica (A e B) e desidrogenase láctica (C e D) em plantas de ingazeiro. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

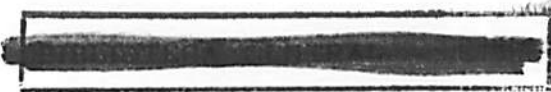
Em plantas submersas foi verificado um aumento significativo na atividade da enzima ADH a partir do 3 DAIT, tanto nas folhas quanto nas raízes em comparação ao tratamento sem submersão. O aumento na atividade da ADH

e ativação da fermentação etanólica em resposta à submersão tem sido mencionado por ser uma característica de tolerância à submersão, pois se torna evidente que espécies tolerantes são capazes de aumentar a respiração anaeróbica para compensar a deficiência de oxigênio (Drew, 1997; Ellis et al., 1999; Kato-Noguchi, 2000; Summers et al., 2000).

Por outro lado, a atividade da LDH nas folhas das plantas submersas apresentou um aumento até 7 DAIT. Após esse período verificou-se uma redução na atividade da mesma, até o final do experimento. Notou-se, também, que nas raízes houve um aumento na atividade da enzima da LDH durante os 15 primeiros DAIT, com posterior decréscimo na sua atividade. Associados a esses aumentos nas atividades das enzimas ADH e LDH não se verificou aumento na concentração de proteínas segundo a Figura 10A.

Os resultados estão de acordo com os encontrados por Tribuzy (1998), que menciona que os maiores valores das atividades da ADH e LDH foram observados nas folhas e raízes de ingazeiro que estavam completamente submersas comparadas às plantas com submersão apenas do sistema radicular. Já Moraes et al. (2001) não verificaram diferenças entre as atividades da ADH e LDH, tanto nas raízes quanto nas folhas de várias espécies vegetais estudadas, quando submetidas ao tratamento de submersão.

Em resposta à baixa disponibilidade de oxigênio, verifica-se indução do metabolismo anaeróbico em várias espécies vegetais (Drew, 1994, 1997; Ellis et al., 1999; Kato-Noguchi, 2000; Summers et al., 2000). Com a limitação de oxigênio, ocorre aceleração da glicólise, conhecido como efeito Pasteur, fundamental para suprir energia e manter a atividade metabólica mínima (Summers et al., 2000). No presente experimento, o comportamento do ingazeiro revelou capacidade de acionar o metabolismo anaeróbico, que permitiu a manutenção da produção de ATP e reciclagem do poder redutor sob tratamento anaeróbico, essenciais à sobrevivência da espécie. Segundo Drew (1997), a



fermentação láctica está limitada à fase de transição entre o metabolismo aeróbico e a fermentação etanólica, enquanto Summers et al. (2000) afirmam que a via fermentativa, principalmente a etanólica, está associada com a disponibilidade de sacarose, provavelmente devido ao metabolismo do amido.

#### **4.8 Atividade das enzimas redutase do nitrato e sintase do glutamato (GOGAT – NADH)**

<sup>1</sup> Observa-se, na Figura 12, que não houve atividade da redutase do nitrato nas folhas das plantas submersas. Nas folhas e raízes das plantas mantidas sem submersão, o decréscimo observado na atividade da enzima, durante todo período experimental, em parte foi provavelmente devido à não reposição dos nutrientes da solução nutritiva, especialmente o  $\text{NO}_3^-$ , devido à perda por “lavagem” do substrato.<sup>1</sup>

→ <sup>1</sup> Nas raízes submersas verificou-se que houve um decréscimo, durante o período de avaliação e sempre menor em comparação ao controle, enfatizando que o tratamento de submersão afetou significativamente o metabolismo do nitrogênio.<sup>1</sup> O mesmo comportamento foi encontrado por Botelho (1996) trabalhando com ingazeiro em condição de submersão total. Este autor não verificou atividade nas folhas das plantas até os 45 DAIT, enquanto que nas raízes, no mesmo período, verificou uma atividade mínima próxima à obtida neste trabalho.

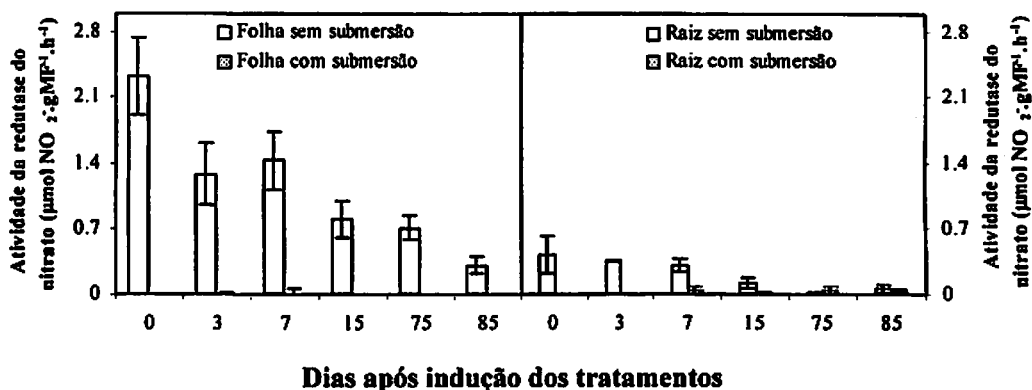
Da mesma forma, Ishida (1998), estudando gramíneas, verificou redução na atividade da redutase do nitrato nos tecidos foliares das duas espécies estudadas. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados por Trybuzi (1998) nas mesmas condições, verificando aumento na atividade da redutase do nitrato acentuado nas folhas e raízes de ingazeiro. Contudo, o autor menciona que o expressivo aumento na atividade específica desta enzima poderia estar

relacionado especificamente a um decréscimo significativo no teor de proteínas, o qual foi a base de expressão dos seus resultados. Por outro lado, Pelacani (1992), trabalhando em condição de submersão do sistema radicular, verificou aumento na atividade da redutase do nitrato em relação às plantas mantidas sem submersão.

A atividade da redutase do nitrato é bastante variável entre as espécies. Botelho (1996) sugere que a redução na atividade da RN estaria estritamente relacionada com a redução na capacidade de produção de esqueletos de carbonos em relação à queda na taxa fotossintética. Entretanto, neste trabalho, a diminuição da atividade da redutase do nitrato (Figura 12) parece não estar relacionada diretamente com a redução da fotossíntese potencial (Figura 7). Blom et al. (1994), trabalhando com *Rumex palustris*, mencionam que quando se fornece  $N-NO_3^-$  ao meio, a atividade da redutase do nitrato em folhas de plantas com submersão do sistema radicular apresentava-se similar à das plantas mantidas em condições não submersas, enquanto em plantas *Rumex crispifloros* a atividade da redutase do nitrato decresceu significativamente, comparadas à das plantas não submersas. Hsu et al. (1999) verificaram que a atividade da RN em raízes de macieiras decresceu com o decorrer do período de observação. Isto, provavelmente, deveu-se à redução da assimilação de nitrato pelas raízes e ao fato de que a síntese da redutase do nitrato é regulada pelo substrato, pois, em solos alagados, ocorre um acúmulo de amônio, devido à ausência de oxigênio interromper o processo de mineralização do nitrogênio para forma amoniacal (Ponnamperuma, 1972).

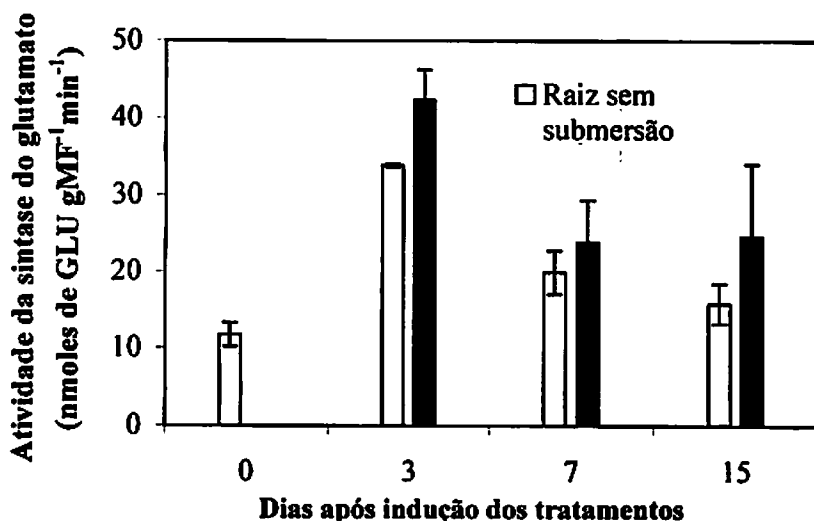
Nabben (2001) verificou que as rotas de redução do nitrato e da fermentação láctica não são importantes na regeneração de  $NAD^+$  em espécies de *Rumex* em condições de submersão total, embora, a atividade da LDH *in vitro* tenha aumentado marcadamente. A regeneração de NADH está mais provavelmente associada à fermentação etanólica. Fox et al. (1994) observaram

que a atividade *in vitro* das redutases do nitrato e do nitrito em plantas de *Echinochloa phyllopogon* não diferiram quando submetidas à anaerobiose em relação às plantas controle e verificou que a redução do nitrato oxida apenas 34% do NAD(P)H produzido diariamente durante anaerobiose, para compensar o requerimento de energia durante o crescimento anaeróbico.



**FIGURA 12:** Atividade da redutase do nitrato em plantas de ingá submetidas à submersão total. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

De maneira geral, os resultados da atividade da GOGAT apresentados na Figura 13 não diferiram entre o tratamento submerso e o não submerso. Entretanto, observa-se uma maior atividade aos 3 DAIT. O mesmo comportamento foi observado por Tribuzy (1998) com a isoforma Fd-GOGAT em folhas de ingazeiro na área de depleção às margens do reservatório de Camargos, enquanto que em condições de cultivo semi-controlados em vaso verificou-se o mesmo comportamento da redutase do nitrato.



**FIGURA 13:** Atividade da GOGAT NADH em raízes de plantas de ingá submetidas à submersão total. As colunas representam média de quatro repetições e as barras em cada coluna indicam o erro padrão da média.

#### 4.9 Período pós-submersão

##### 4.9.1 Indicadores de recuperação

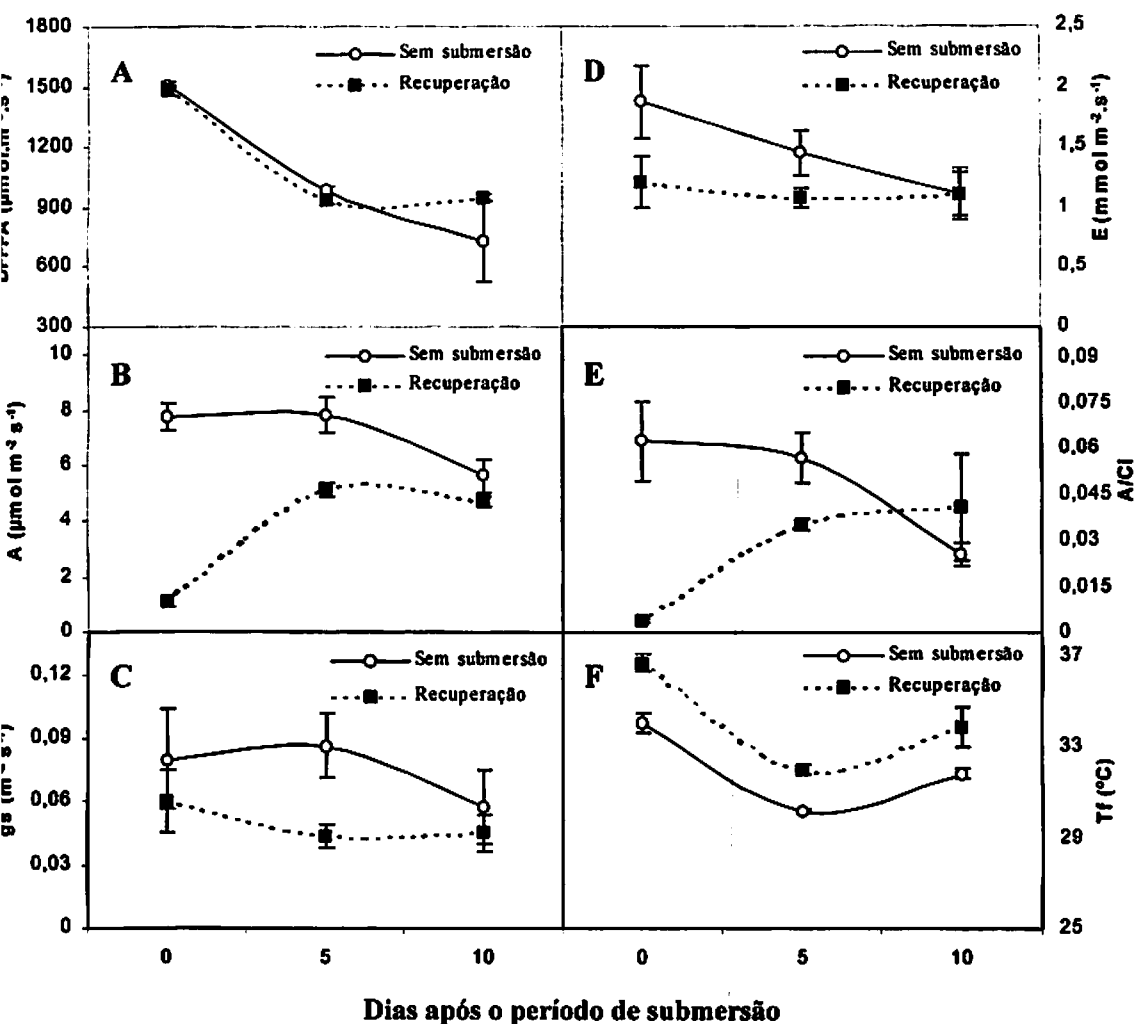
Todas as plantas utilizadas neste experimento demonstraram tolerância à anoxia e sobreviveram aos 75 dias de submersão total. Após esse período, a readaptação das plantas às condições normais de disponibilidade de O<sub>2</sub> foi bem sucedida. As plantas manifestaram sinais de recuperação, visualizados principalmente pela retomada dos lançamentos foliares evidenciando crescimento normal e vigoroso. Provavelmente, a sobrevivência das plantas de ingá deveu-se a alterações no seu metabolismo, as quais evitaram a toxicidade de produtos da respiração anaeróbica dos tecidos da planta em baixa

disponibilidade de oxigênio, proporcionando a tolerância. Entretanto, o retorno das plantas às condições normais de oxigênio atmosférico pode ter causado algum dano aos tecidos, proporcionando decréscimo na sobrevivência e no crescimento, podendo ser revertido pelo sistema antioxidante da planta (Blohkina, 2000).

#### 4.9.2 Trocas gasosas

Na Figura 14 observam-se as respostas de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*), taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), eficiência de carboxilação (*A/Ci*) e temperatura foliar ( $T_f$  °C) nas plantas submersas e não submersas após o retorno das condições drenadas. A suspensão da submersão evidenciou a recuperação progressiva dessas variáveis. A taxa de fotossíntese líquida no início da recuperação correspondeu a 16% em relação ao tratamento não submerso. A fotossíntese líquida e a eficiência de carboxilação apresentaram variações semelhantes, recuperando-se gradualmente após 10 dias, não diferindo das plantas sem submersão (Figuras 14B e 14E), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Ahmed et al. (2002).

Em geral, a queda na taxa de fotossíntese líquida em condições de submersão se deve a fatores não estomáticos como a degradação da clorofila e inativação das enzimas de carboxilação (Joseph & Yelenosky, 1991; Liao & Lin, 1994; Pezeshki et al., 1996; Lopez & Kursar, 1999). Sendo assim, o mesmo comportamento pode ser observado para as demais variáveis. Fernandez et al. (1999) verificaram que a manutenção do conteúdo de Rubisco não garante, necessariamente, a sua atividade, pois o estado de ativação pode diminuir, resultante da sombra produzida pela coluna d'água, conforme observado na Tabela 1.



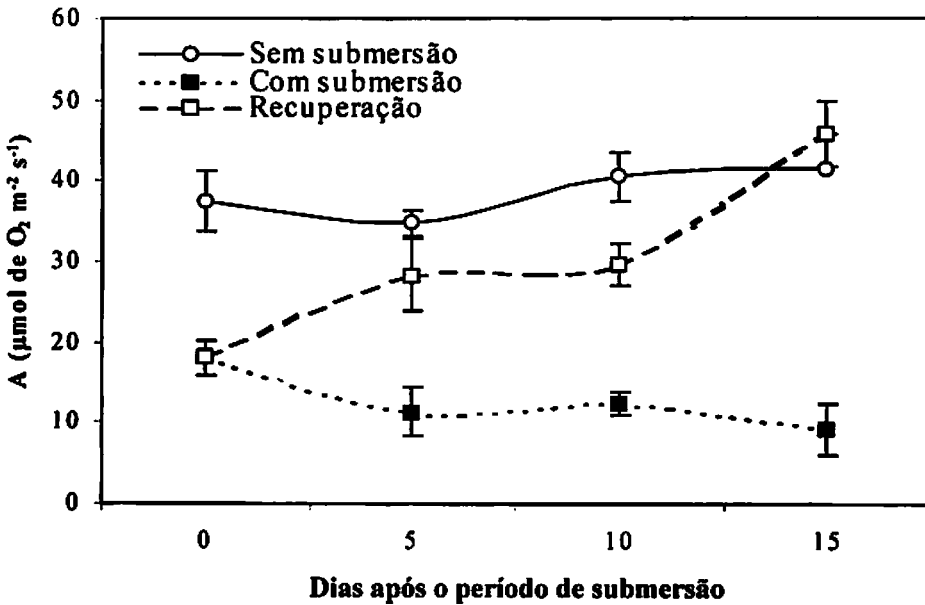
**FIGURA 14:** Densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (A), fotossíntese líquida (B), condutância estomática (C), transpiração (D), eficiência fotossintética (E) e temperatura foliar (F) em plantas de ingá. Médias de quatro repetições. As barras indicam o erro padrão da média.



A redução da taxa de fotossíntese líquida observada no início da suspensão da submersão está relacionada diretamente a fatores não estomáticos (Liao & Lin, 1994; Pezeshki et al., 1996; Lopez & Kursar, 1999), enquanto que, em condições de submersão parcial, vários autores relacionam a diminuição na fotossíntese à condutância estomática (Gravatt & Kirby, 1998; Fernandez et al., 1999; Ahmed et al., 2002). Entretanto, a taxa transpiratória não seguiu o mesmo comportamento da condutância estomática, sugerindo que as folhas não foram afetadas pelo retorno das plantas às condições normais de oxigênio atmosférico. (Figura 14 D). Esses resultados são compatíveis com aqueles obtidos por Ishida (1998) em gramíneas. No entanto, a taxa transpiratória pode ser afetada quando a temperatura torna-se bastante elevada (Figura 14 F), induzindo o fechamento estomático.

#### **4.9.3 Fotossíntese potencial**

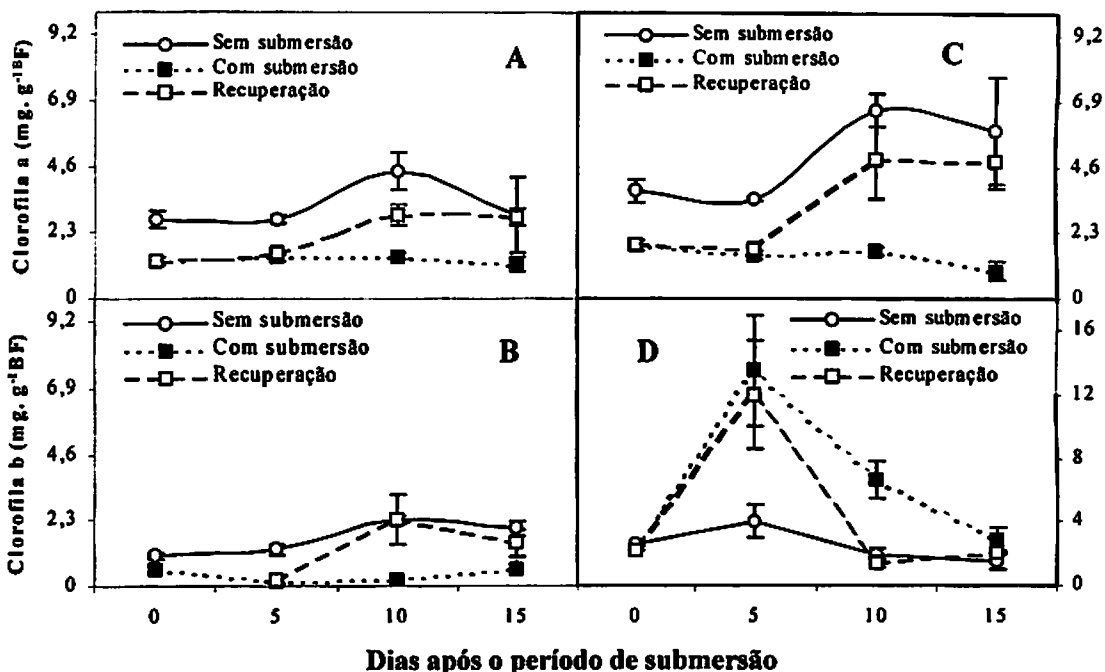
Verifica-se, na Figura 15, que a fotossíntese potencial foi menor no início do período de pós-submersão. Contudo, observou-se uma recuperação progressiva da fotossíntese potencial, chegando a se igualar estatisticamente com as plantas não submersas. No entanto, para plantas mantidas em condições de submersão, a fotossíntese potencial continuou a decrescer, estabilizando-se nas avaliações subseqüentes. Resultados indicadores da recuperação da fotossíntese após um período prolongado de submersão também foram encontrados por Ahmed et al. (2002) em feijão de corda.



**FIGURA 15:** Fotossíntese potencial em plantas de ingá. Média de quatro repetições. As barras indicam o erro padrão da média.

#### 4.9.4 Teor de clorofila

Os teores de clorofilas são apresentados na Figura 16, onde se verifica, de maneira geral, um aumento nas folhas das plantas, logo após o período de submersão. Durante o período pós-submersão as plantas retomaram em 10 dias a capacidade de síntese dos componentes do aparato fotossintético e, em 15 dias as concentrações de clorofilas igualaram-se às das plantas não submersas. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Ahmed et al. (2002).

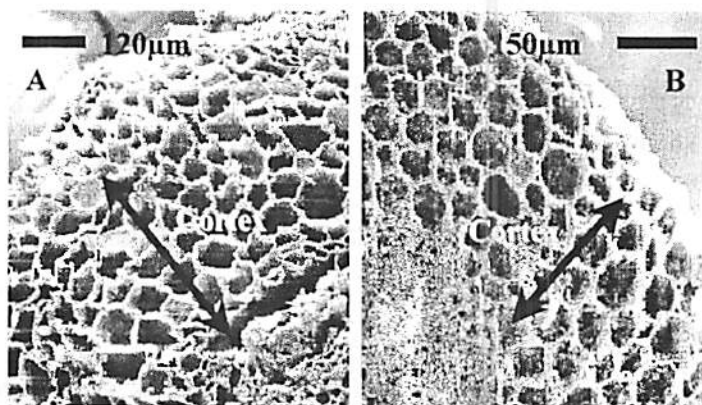


**FIGURA 16:** Teores de clorofilas a (A), b (B), total (C) e a/b (D), em plantas de ingá. Média de quatro repetições. As barras indicam o erro padrão da média.

#### 4.9.5 Anatomia das raízes

Não houve formação de aerênquima e lenticelas hipertrofiadas nas raízes de plantas de ingá submetidas à deficiência de oxigênio induzidas pela submersão total (Figura 17). Isso pode ser atribuído à baixa plasticidade fenotípica do ingazeiro para formar aerênquima, além do fato de não existir contato da parte aérea com o ar atmosférico que possibilitasse o transporte de oxigênio para as partes submersas e, dessa forma, não necessita formar aerênquima. Entretanto, a síntese de etileno necessita, em sua via metabólica, do

oxigênio para converter ACC em etileno (Drew, 1997). Esses resultados são similares aos encontrados por Botelho (1996), que verificou em plantas de ingá sob submersão total a não formação de lenticelas hipertrofiadas e aerênquimas na região do córtex durante o período de submersão total.



**FIGURA 17:** Micrografia eletrônica de varredura da secção transversal de raízes laterais de plantas de ingá submersas durante 75 DAIT. Sem submersão (A) e submerso (B).

## 5 CONCLUSÕES

A submersão total durante 75 dias promoveu uma redução do crescimento das plantas de ingá. Nas plantas submersas, o ponto de saturação lumínica para a fotossíntese potencial foi atingido em níveis de DFFFA aproximados de  $300 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , enquanto nas plantas não submersas a fotossíntese potencial permaneceu crescente até níveis de DFFFA próximos a  $1.600 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Nas plantas submersas, os teores de AST das folhas reduziram, mas os teores de AR permaneceram estáveis. Nestas plantas, as atividades das enzimas ADH e LDH, *in vitro*, aumentaram significativamente em raízes e folhas. Por outro lado, a atividade, *in vivo*, da reductase do nitrato decresceu significativamente nos mesmos tecidos. A atividade da NADH-GOGAT, *in vitro*, permaneceu inalterada nas plantas submersas.

Apesar do estresse causado por restrição de  $\text{O}_2$  e luminosidade, as plantas de ingá demonstraram boa capacidade de recuperação de suas principais características fisiológicas. Depois do período de submersão, em 15 dias o seu crescimento foi retomado e restabelecido a capacidade de realização de trocas gasosas, fotossíntese potencial e teores de clorofilas, cujos níveis equipararam-se aos das plantas não submersas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.; NAWATA, M. H.; DOMAE, Y.; SAKURATANI, T. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Science, Clare*, v. 163, n. 1, p. 117-123, July 2002.

ANDRADE, A. C. S. de; RAMOS, F. N.; SOUZA, A. F. de; LOUREIRO, M. B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. *Revista Brasileira de Botânica, São Paulo*, v. 22, n. 2, p. 281-285, out. 1999. (Suplemento).

APHA, Standart methods for examination of water and wasterwater. American Publishing Health Association, 1998.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-Aeration following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiology, Praha*, v. 116, n. 1, p. 651-658, 1998.

BLOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J.; BANGA, M.; ENGELAAR, W. M. H. G.; RIJNDERS, J. H. G. M.; VAN DE STEEG, H. M.; VISSER, E. J. W. Physiological ecology of Riverside Species: Adaptive Response of Plants to Submergence. *Annals of Botany, London*, v. 74, n. 3, p. 253-263, Sept. 1994.

BLOKHINA, OB. Anoxia and Oxidative stress: Lipid Peroxidation, Antioxidant Status and Mitochondrial Functions in Plants. 2000. 79 p. Dissertation. University of Helsinki, Helsinki, the Finland.

BLOKHINA, OB.; FAGERSTED, K. V.; CHIRKOVA, T. VV. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxia reeration. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*, v. 105, n. 4, p. 625-632, Apr. 1999.

BOLLE-JONES, E. W. Cooper, its effects on the growth of the rubber plant (*Hevea brasiliensis*). *Plant and Soil, The Hague*, v. 10, n. 2, p. 168-178, 1959.

BOTELHO, M. N. Estudo de características adaptativas à submersão de plantas de ingazeiro (*Ingazeiro Vera Willd.*), *Virola* (*Virola surinaminensis* (Roland. Ex Rottb.) e seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). 1996. 49

p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, C. J. R.; ISHIDA, F. Y. Resposta de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) jovens ao alagamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 9, p. 1231-1237, Set. 2002.

CRAWFORD, R. M. M. Metabolic adaptations to anoxia In: HOOK, D. D.; CRAWFORD, R. M. M. (Ed.). *Plant life in anaerobic environments*. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1958. p. 119-136.

CHEN, H.; QUALLS, R. G.; MILLER, G. C. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, 2002. in press.

DAVIDE, A. C. Comportamento de espécies florestais em área de depleção do reservatório da usina hidrelétrica de Camargos-Itutinga, MG. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PRODUÇÃO E TRANSMISSÃO DE ENERGIA ELÉTRICA, 14., 1997, Belém-PA,

DELIEU, T.; WALKER, D. A. Polarographic measurement of photosynthetic oxygen evolution by leaf discs. *New Phytologist*, Cambridge, v. 89, n. 2, p. 165-178, 1981.

DELIEU, T.; WALKER, D. A. simultaneous measurement of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. *Plant Physiology*, Rockville, v. 73, n. 3, p. 534-541, Nov. 1983.

DELÚ FILHO, N. Efeito do N-NO<sub>3</sub> sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) 1994. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DIAS-FILHO, M. B.; CARVALHO, C. J. R. de. Physiological and morphological responses of *Brachiaria* spp. to flooding. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1959-1966, Out. 2000.

DORDAS, C.; RIVOAL, J.; HILLR, D. Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Annals of Botany*, London, v. 91, p. 173-178, Jan. 2003. Supplement.

DREW, M. C. Oxygen Deficiency And Root Metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, 1997.

DREW, M. C.; COBB, B. G.; JOHNSON J. R.; ANDREWS D. Metabolic acclimation of root tips to oxygen deficiency. *Annals of Botany*, London, v. 74, n. 3, p. 281-286, Sept. 1994.

ELLIS, M. H.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Arabidopsis Roots and Shoots Have Different Mechanism for Hypoxic Stress Tolerance. *Plant Physiology*, Rockville, v. 119, n. 1, p. 57-64, Jan. 1999.

FAN, T. W-M.; HIGASHI, R. M.; FRENKIEL, T. A.; LANE, A. N. Anaerobic nitrate and ammonium metabolism in flood-tolerance rice coleoptiles. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 48, n. 314, p. 1655-1666, Sept. 1997.

FERNANDEZ, M. D.; PIETERS, A.; DONOSO, C.; HERERA, C.; TEREZA, W. Seasonal changes in photosynthesis of trees in the flooded forest of the mapire river. *Tree Physiology*, Victoria, v. 19, n. 2, p. 79-85, Feb. 1999.

FOX, T. C.; KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. *Annals of Botany*, London, v. 74, n. 5, p. 445-455, Nov. 1994.

GARDINER, E. S.; KRAUSS, K. W. Photosynthetic light response of flooded *Cherrybark oak* (*Quercus pagoda*) seedling grown in two light regimes. *Tree Physiology*, Victoria, v. 21, n. 12/13, p. 1103-1111, Aug. 2001.

GRAVATT, D. A.; KIRBY, C. J. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. *Tree Physiology*, Victoria, v. 18, p. 411-417, 2001.

HOLDEN, M. Chlorophylls. In: GOODWING, T. W. (Ed.). *Chemistry and biochemistry of plant pigments II*. New York: Academic Press, 1976. p. 7.

HSU, Y. M.; TSENG, M, J.; LIN, C. H. The fluctuation of carbohydrates and nitrogen compounds in flooded wax-apple trees. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, Taipei, v. 40, n. 3, p. 193-198, July 1999.



HUANG, B.; JOHNSON, J. W. Root respiration and carbohydrate status of two wheat genotypes in response to hypoxia. *Annals of Botany*, London, v. 75, n. 4, p. 427-432, Apr. 1995.

ISHIDA, Y. I. Crescimento, trocas gasosas, fluorescência e assimilação de nitrogênio em plantas de *Setaria anceps* e *Paspalum repens* submetidas à inundação parcial e total. 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ITO, O.; ELLA, N.; KAWANO, N. Physiological basis of submergence tolerance in rainfed lowland rice ecosystem. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 75-90, Nov. 1999.

JOLY, C. A.; CRAWFORD, R. M. M. Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. *Journal of Experimental Botany*. Oxford, v. 33, n. 135, p. 799-809, Oct. 1982.

JOSEPH, C. V. V.; YELENOSK, Y. Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 81, n. 1, p. 7-14, Jan. 1991.

KATO-NOGUCHI, H. Abscisic acid and hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of lettuce seedlings. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, n. 352, p. 1939-1944, Nov. 2000.

KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plant. *Plant Physiology*, Rockville, v. 100, n. 1, p. 1-6, Sept. 1992.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology*, Victoria, n. 1, p. 1-29, 1997. Disponível em: <<http://www.heronpublishing.com/tp/monograph/kozlowski.pdf>>. Acesso em: 20/03/2001.

LAAN, P.; TOSSERAMS, M.; BLOM, C. W. P. M.; VEEN, B. W. Internal oxygen transport in *Rumex* species and its significance for respiration under hypoxic conditions. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 39-46, Feb. 1990.

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

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Effects of flooding stress on photosynthetic activities of *Momordica charantia*. *Plant Physiology Biochemistry*, Paris, v. 32, n. 4, p. 479-485, July/Aug. 1994

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plant to flooding stress. *Proceedings of National Science Council ROC(B)*, Taipei, v. 25, n. 3, p. 148-157, 2001.

LOPEZ, O. R.; KURSAR, T. A. Flood tolerance of four tropical tree species. *Tree Physiology*, Victoria, v. 19, n. 14, p. 925-932, Dec. 1999.

MAUCHAMP, A.; BLANCH, S.; GRILLAS, P. Effects of submergence on the growth of *Phragmites australis* seedlings. *Aquatic Botany*, Amsterdam, v. 69, n. 2/4, p. 147-164, Apr. 2001.

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

MORAES, M. G. de. Caracterização do crescimento e da atividade desidrogenases alcoólica e láctica em seis espécies herbácea sob condições de hipoxia. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 1, p. 86-95, jan./fev.2001.

NABBEN, R. H. M. *Metabolic adaptations to flooding-induced oxygen deficiency and post-anoxia stress in Rumex species*. 2001. 131 p. Thesis. (PhD.) - Katholieke Universiteit Nijmegen, Nijmegen, the Netherlands.

NABBEN, R. H. M.; BLOM, C. W. P. M.; OESENEKĀ, L. A. C. J. Resistance to complete submergence in *Rumex* species with different life histories: the influence of plant size and light. *New Phytologist*, Cambridge, v. 144, n. 2, p. 313-321, Nov. 1999.

NAIK, M. S.; ABROL, Y. P.; NAIR, T. V. R.; RAMARAO, C. S. Nitrate assimilation – Its regulation and relationship to reduced nitrogen in higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, n. 3, p. 495-504, Mar. 1982.

NÚÑEZ-ELISEA, R.; SHAFFER, B.; FISHER, J. B.; COLLS, A. M.; CRANE, J. H. Influence of Flooding on Net CO<sub>2</sub> Assimilation, Growth and stem Anatomy of anna Species. *Annals of Botany*, London, v. 84, n. 6, Dec. 1999.

OLIVEIRA, L. E. M.; RIBEIRO, R. V.; ALVES, R. T.; GUERRA NETO, E. G.; DELÚ-FILHO, N.; ALVES, J. D. Revegetação de áreas de depleção de

reservatórios hidrelétricos. In: SIMPÓSIO MATA CILIAR: Ciência e tecnologia, 1999, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 1999. p. 136-171.

PELACANI, C. R. Estratégia de sobrevivência de plantas herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à inundação d sistema radicular. 1992. 110 p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PERATA, P.; ALPI, A.; Plant responses to anaerobioses. *Plant Science*, Limerick, v. 93, n. 1/2, p. 1-17, Jan. 1993.

PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DeLAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiology*, Victoria, v. 16, n. 4, p. 453-458, Apr. 1996.

PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of submerged soils. *Advances in Agronomy*, New York, v. 24, p. 29-96, 1972.

PLAXTON, W. C. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 47, p. 185-214, 1996.

PUIATTI, M.; SODEK, L. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiology Biochemistry*, Paris, v. 37, n. 10, p. 767-773, Oct. 1999.

RASCIO, N. The underwater life of secondarily aquatic plant: Some problems and solutions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 21, n. 4, p. 401-427, Apr. 2002.

RAWYLER, A.; ARPAGAU, S.; BRAENDLE.; Impact of oxygen stress and energy availability on membrane stability of plant cells. *Annals of Botany*, London, v. 90, n. 4, p. 499-507, Oct. 2002.

REGGIANI, R.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. Effects of exogenous nitrate anaerobic metabolism in excised rise roots. II. Fermentative activity and adenylic energy charge. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 36, n. 172, p. 1698-1704, Nov. 1985.

REGGIANI, R.; CANTÚ, C. A.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. Accumulation and interconversion of amino acids in rise roots under anoxia. *Plant Cell Physiology*, Tokyo, v. 29, n. 6, p. 981-987, Sept. 1988.

ROBERTS, J. K. M.; CALLIS, J.; WEMMER, R.; WALBOT, V.; JARDETZKY, O. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. *Proceedings of National Academic Science of the United States of America*, Washington, v. 81, n. 11, p. 3379-3383, 1984.

SAGLIO, P. H.; DREW, M. C.; PRADET, A. Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2-4Kpa parcial pressure) oxygen pretreatment (hypoxia) in roots tips of *Zea mays*. *Plant physiology*, Rockville, v. 86, n. 1, p. 61-66, Jan. 1988.

SOUZA, C. A. de. **Metabolismo do nitrogênio em plantas de soja [*Glycine Max* (L.) Merr. Cv IAC-17] submetidas à deficiência de O<sub>2</sub> no sistema radicular.** 2001a. 102 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade de Campinas, Campinas, SP.

SOUZA, C. A. de.; SODEK, L. Metabolic changes in soybean plants in response to waterlogging in the presence of nitrate. *Physiological Molecular Biology Plants*, v. 8, n. 1, p. 97-104, 2002.

SOUZA, J. G. de.; MACEDO BELTRÃO, N. E. de.; SANTOS, J. W. dos. Fisiologia e produtividade do algodoeiro em solo encharcado na fase de plântula. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 36, n. 3, p. 425-430, mar. 2001b.

SUMMERS, J. E.; RATCLIFFE, G. R.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1413-1422, Aug. 2000.

TRIBUZY, E. S. **Metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de ingazeiro (*Ingazeiro Vera* Willd.) submetidas a diferentes alturas e tempos de submersão.** 1998. 64p. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VANN, C. D.; MEGONIGAL, J. P. Productivity responses of *Acer rubrum* and *Taxodium distichum* seedlings to elevated CO<sub>2</sub> and flooding. *Environmental Pollution*, Oxford, v. 116, p. S31-S36, 2002. Supplement.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptation to anaerobic stress. *Annals of Botany*, London, v. 79, p. 3-20, Jan. 1997. Supplement A.

VERVUREN, P. J. A.; BEURSKENS, S. M. J. H.; BLOM, C. W. P. M. Light acclimation, CO<sub>2</sub> response and long-term capacity underwater photosynthesis in three terrestrial. *Plant Cell and Environment*, Oxford, v. 22, n. 8, p. 959-968, Aug. 1999.

VISSER, E. J. W.; VOESENEK, L. A. C. J.; VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Flooding and Plant Growth. *Annals of Botany*, London, v. 91, p. 107-109, Jan. 2003. Supplement.

WATER, I.; MORRELL, H.; GREENWAY, H.; COLMER, T. D. Effects of Anoxia on Wheat Seedlings. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 42, n. 244, p. 1437-1447, Nov. 1991.

WELLS, C. L.; PIGLIUCCI, M. Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, Jena, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2000.

XIA, J.-H.; ROBERTS, J. K. M. Regulation of H<sup>+</sup> Extrusion and Cytoplasmic pH in Maize Root Tips Acclimated to a Low-Oxygen Environment. *Plant Physiology*, Rockville, v. 111, n. 1, p. 227-233, May 1996.

XIA, J.-H.; SAGLIO, P. H. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation maize root tips to anoxia. *Plant Physiology*, Rockville, v. 100, n. 1, p. 40-46, Sept. 1992.

YAMAMOTO, F.; SAKATA, T.; TERAZAWA, K. Physiological, morphological and anatomical responses of *Fraxinus mandshurica* seedlings to flooding. *Tree Physiology*, Victoria, v. 15, n. 11, p. 713-719, Nov. 1995.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, Cambridge, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry Journal*, London, v. 57, n. 3, p. 508-5514, 1954.

YOSHIDA, S.; EGUCHI, H. Environmental analysis of aerial O<sub>2</sub> transport through leaves for root respiration in relation to water uptake in cucumber plants

*(Cucumis sativus* L.) in O<sub>2</sub> – deficient nutrient solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 271, p. 187-192, Feb. 1994.

ZHANG, J.; GREENWAY, H. Anoxia tolerance and anaerobic catabolism of aged beetroots storage tissues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, n. 274, p. 567-575, 1994.