

**METABOLISMO DO CARBONO E DO
NITROGÊNIO EM PLANTAS DE INGÁ (*Inga vera*
Willd.) SUBMETIDAS A DIFERENTES ALTURAS E
TEMPOS DE SUBMERSÃO**

EDGARD SIZA TRIBUZY

1998

EDGARD SIZA TRIBUZY

**METABOLISMO DO CARBONO E DO NITROGÊNIO EM PLANTAS
DE INGÁ (*Inga vera* Willd.) SUBMETIDAS A DIFERENTES ALTURAS
E TEMPOS DE 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 a obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1998

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

Tribuzy, Edgard Siza

Metabolismo de carbono e do nitrogênio em plantas de ingá (*Ingá vera* Willd.) submetidas a diferentes alturas e tempos de submersão /
Edgard Siza Tribuzy. – Lavras: UFLA, 1998.
64 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Ingá. 2. Estresse gasoso. 3. Metabolismo de nitrogênio. 4. Metabolismo de carbono. 5. Anoxia. 6. Alagamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973321

EDGARD SIZA TRIBUZY

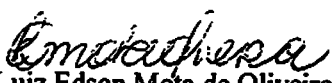
**METABOLISMO DO CARBONO E DO NITROGÊNIO EM PLANTAS
DE INGÁ (*Inga vera* Willd.) SUBMETIDAS A DIFERENTES ALTURAS
E TEMPOS DE SUBMERSÃO**

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

APROVADA em 18 de setembro de 1998

Prof.^o Dr. José Donizeti Alves - UFLA

Prof.^o Dr.^a Ângela Maria Soares - UFLA


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

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**"Se a carne foi feita em razão do espírito,
é uma maravilha.**

**Se o espírito foi feito em razão do corpo,
É a maravilha das maravilhas.**

**Mas do que eu mais me maravilho é disto:
Como essa grande riqueza
Instalou-se nessa pobreza?..."**

J.J. Benites

Dedico este trabalho a:

**meus pais, Ivan de Azevedo Tribuzy e Edith Siza Tribuzy;
meus irmãos, Jorge, Ivan, Myrian, Esther, Rachel e Daniella;
e principalmente a minha esposa, Jucleide, e a minha filha Sarah que
compreenderam e perdoaram minha longa ausência, enquanto realizava este
trabalho.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem feito por mim.

Aos meus pais, aos irmãos e à minha nova família.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de formação profissional.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo.

A CEMIG pelo apoio dado ao projeto.

Ao educado Luiz Edson Mota de Oliveira, pela orientação sob todos os aspectos e como exemplo profissional.

Ao professor Dr. José Donizeti Alves pela inestimável contribuição na correção e elaboração da dissertação.

À professora Dra. Ângela Maria Soares, pelas contribuições, co-orientação e participação na defesa de dissertação.

Aos professores Amauri A. Alvarenga e Renato Paiva, pelos ensinamentos e experiências que enriqueceram nossos conhecimentos.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, Fábio M. da Matta e Carlos A. Martinez, pela cooperação, paciência e atenção.

Ao amigo Paulo Henrique Peixoto, pelo apoio e incentivo

Aos funcionários do Depto. de Biologia, Izonel, Dartagnan, Evaristo e Leninha, pela amizade e auxílio e, em especial, aos funcionários Joel e Odorêncio, grandes responsáveis pelo bom andamento de todos os experimentos.

Aos amigos e companheiros, os alunos de Iniciação Científica, Rafael Vasconcelos Ribeiro e Rodrigo Teixeira Alves, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao Denis, Yoko, Chryz, Marcos (Magrão) e Darlan pela inestimável amizade e indispensável ajuda nas análises laboratoriais e ajuda nos experimentos.

Às grandes amizades conquistadas em Lavras, Denis, Adriana e Júlia minha outra família, Yoko, Vespasiano, Marcel, André, Marlos, Lucivane, Leslie, Dalva, meu irmãozinho Rodrigo (anão), Rafael, Rodrigo (Teixeira) meu amigo do peito, Marco Aurélio (Fuça), Carlos, Darlan (Chala Magra), Gabriela, Lucimeire e a tantos outros que contribuíram e participaram do momentos de felicidade.

Aos meus amigos de MAO, que só souberam me incentivar, Nilson, Tadeu, Rodrigo Serpa, Marcelo (brother) e Adilson.

Aos meus cunhados, Marcos de Almeida e a Jucilene de Lima, pelo imenso apoio e carinho que deram a minha esposa.

A Jucleide da Silva de Lima, por ter estado a meu lado nas minhas maiores dificuldades e alegrias e por ter me dado a maior alegria da minha vida, nossa filha Sarah Talita.

Em especial a minha MÃE Edith Siza Tribuzy e a meu pai Ivan de Azevedo Tribuzy, que não mediu esforços para que eu concluísse este curso.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Respostas morfológicas das plantas em um ambiente inundado	3
2.2. Metabolismo do carbono em plantas sob baixa disponibilidade de oxigênio	4
2.2.1. Fotossíntese	4
2.2.2. Respiração	6
2.3. Metabolismo do nitrogênio em plantas sob baixa disponibilidade de oxigênio	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Condução do experimento	9
3.1.1. Experimento em condições de viveiro	9
3.1.2. Experimento em condições de campo	11
3.1.2.1. Caracterização da área de campo	11
3.1.2.2. Avaliações na área do reservatório de Camargos	13
3.2. Material vegetal analisado	15
3.3. Características avaliadas	16
3.3.1. Características de crescimento	16
3.3.2. Trocas gasosas	17
3.3.3. Fotossíntese potencial	17

3.3.4. Fluorescência	18
3.3.5. Clorofila a, b e total	18
3.3.6. Atividades enzimáticas	19
3.3.6.1. Preparo do material	19
3.3.6.2. Obtenção dos extratos enzimáticos	19
3.3.6.3. Ensaio da redutase do nitrato	20
3.3.6.4. Ensaio da glutamina sintetase	21
3.3.6.5. Ensaio da glutamato sintase dependente da ferredoxina	21
3.3.6.6. Ensaio da álcool desidrogenase	22
3.3.6.7. Ensaio da lactato desidrogenase	22
3.3.7. Açúcares solúveis totais	23
3.3.8. Açúcares redutores	23
3.3.9. Amido	23
3.3.10. Proteínas	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Crescimento da planta	25
4.2. Trocas gasosas, eficiência fotoquímica e conteúdo de clorofila	27
4.3. Teores de açúcares solúveis totais (AST), redutores (AR) e amido.	40
4.4. Teor de proteínas	44
4.5. Atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase	46
4.6. Atividade da redutase do Nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT)	50
5. CONCLUSÕES	56
6. BIBLIOGRAFIA	58

RESUMO

TRIBUZY, Edgard Siza. Metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de ingá (*Inga vera* Willd.) submetidas a diferentes alturas e tempos de submersão. Lavras: UFLA, 1998, 64p (Dissertação – Mestrado em Agronomia – Área de concentração Fisiologia Vegetal)*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o metabolismo do carbono e nitrogênio em plantas de ingá submetidas a baixa disponibilidade de oxigênio. Foram avaliadas plantas de sujeitas a diferentes alturas e tempos de submersão, em dois experimentos: um em condições de campo utilizando-se plantas com 4 anos de idade numa área sujeita ao deplecionamento no Reservatório Hidrelétrico de Camargos-Itutinga, e o outro utilizando-se mudas cultivadas em vasos submersos em tanques construídos para este fim, na área de campo do Departamento de Biologia na Universidade Federal de Lavras, em Minas Gerais, Brasil. No experimento de campo, a submersão das plantas foi determinada pelo deplecionamento do nível da água e as avaliações foram feitas em três épocas: 07/09/1997, 28/09/1997 e 06/10/1997, o que induziu a uma submersão total nas plantas avaliadas de 166, 203 e 271 dias, respectivamente e avaliou-se trocas gasosas, eficiência do fotossistema II, atividade das enzimas álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, redutase do nitrato, glutamina sintetase e glutamato sintase, e teores de açúcares e proteínas. No experimento com mudas em vasos submersos em tanque as trocas gasosas e eficiência do fotossistema II foram avaliados aos 4, 8, 12, 15, 20, 26, 31, 34, 38, 42 e 49 dias após a indução dos tratamentos (DAIT); as avaliações de crescimento foram realizadas aos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 34 e 49 DAIT e as demais avaliações enzimáticas e de macromoléculas foram realizadas 15, 34 e 49 DAIT. Verificou-se que o estresse gasoso afetou o crescimento das plantas totalmente submersas; a fotossíntese foi afetada pela altura e tempo de submersão nas plantas em condição de estresse os açúcares foram mais metabólicos que estruturais; as proteínas apresentaram queda nos tecidos submersos, a atividade da álcool e lactato desidrogenase foi

* Comitê Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Orientador), José Donizeti Alves - UFLA e Ângela Maria Soares - UFLA.

maiores nos tecidos estressados, metabolismo do nitrogênio parece estar funcionando normalmente. Conclui-se com este experimento que a fotossíntese foi mais afetada nas plantas com submersão devido a problemas na fixação e redução do carbono e a produção de açúcares nas plantas totalmente submersas foi direcionadas para manutenção do metabolismo. Além disso as enzimas de assimilação e redução do nitrogênio não foram afetadas pela condições adversas causadas pela submersão.

ABSTRACT

TRIBUZY, Edgard Siza. Carbon and nitrogen metabolism of ingá plants (*Inga vera* Willd.) submitted to different submergence height and duration. Lavras: UFLA, 1998, 64p (Dissertation – Master in Plant Physiology)*.

This work had to goal to evaluate the carbon and nitrogen metabolism in inga plants submitted to oxygen deficiency. The inga plants were evaluated submitted in different height and duration of submergence, in two experiment: first in condition of fields making use of 4-years-old plants in a field subjected in a depletion at hydroelectric reservoir at Camargos – Itutinga; and the other making use of seedlings cultivated in vases, submerged in tanks built to this propose, at the biology department at the Federal University of Lavras (UFLA), both experiments were realized in Minas Gerais – Brazil. In a country's experiment of hydroelectric reservoir the plants' submersion were determinated by the depletion of water level an the estimated were done in three times 09/7th/1997, 09/28th/1997 and 10/6th/1997, that induced a total submersion of the evaluated plants of 166, 203 and 271 days, respectively. And were evaluated gas exchange, photosystem II efficiency, the activities of the enzymes alcohol dehidrogenase, lactate dehidrogenase, nitrate reductase, glutamina synthetase and glutamate sintase, and sugars and proteins contents. In the experiment with seedlings in vases submerged in tanks the gas exchange and photosystem II efficiency were evaluated in 4, 8, 12, 15, 20, 26, 31, 34, 38, 42 and 49days after the treatment induction (DATI), the grow evaluations were realized in 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 34 and 49 DATI and the other enzymatic and macromolecule evaluations were realized 15, 34 and 49 DATI. It was checked that the gaseous stress affected the growing of the plants totally submerged, the photosynthesis was affected by the height and duration of submersion, in plants in condition of the stress the sugars were more metabolic then structural, the proteins presented fall in the organs submerged, the activity of the alcohol and lactate dehidrogenase were bigger on the stress organs, nitrogen metabolism seems to be working normally. We can notice with this experiment that: the photosynthesis was more affected on plants with submersion because of problems in the fixation and reduction of carbon; the production of sugars on plants totally submerged was

*Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira (Major Professor), José Donizeti Alves – UFLA and Ângela Maria Soares – UFLA.

used to development of the metabolism; and that the enzymes of assimilation and reduction of nitrogen weren't affect by adverse conditions caused by submersion.

1. INTRODUÇÃO

As áreas marginais aos reservatórios hidrelétricos estão sujeitos a contínuas variações dos níveis de água, o que impede a sobrevivência, o estabelecimento e a permanência de várias espécies nesta zona de deplecionamento de água. Contudo, como se trata de uma área de proteção permanente, deve-se priorizar medidas que visem a revegetação de tais áreas para evitar a erosão e minimizar o assoreamento dos lagos e também favorecer o desenvolvimento da fauna terrestre e aquática destas áreas.

Neste sentido, a Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Extensão (FAEPE) firmaram um convênio que tem, como um dos seus objetivos, identificar e selecionar espécies, nativas ou não as regiões específicas de seus diferentes reservatórios, com aptidão e possibilidade de serem usadas em programas de recomposição da vegetação nesses ambientes sujeitos a diferentes alturas e tempos de inundação.

Seguindo esta linha de pesquisa, alguns trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos com espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas potencialmente promissoras para restabelecer a revegetação dessas faixas de depleção. Os resultados destes trabalhos têm mostrado que várias espécies se destacam pela aptidão em suportar a inundação utilizando de estratégias morfológicas e/ou anatômicas e/ou metabólicas. Diante deste contexto, entre as espécies lenhosas, o ingá tem se destacado como uma das mais promissoras.

Alguns aspectos anatômicos e morfológicos utilizados por esta planta para suportar a submersão já foram descritos, contudo não foi encontrada qualquer informação sobre seu metabolismo do carbono em ambientes hipóxicos e anóxicos e as informações existentes sobre o metabolismo do nitrogênio se restringem aos efeitos da inundação na atividade da enzima redutase de nitrato.

Este trabalho teve o objetivo de estudar alguns aspectos do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de ingá submetidas a diferentes alturas e tempos de submersão através de avaliações de trocas gasosas (H_2O , CO_2), eficiência do fotossistema II, teores de carboidratos e proteínas e atividade das enzimas anaeróbicas álcool e lactato desidrogenase (ADH e LDH, respectivamente), bem como o metabolismo do nitrogênio através das atividades das enzimas redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase dependente de ferredoxina (fd-GOGAT).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Respostas morfológicas das plantas em um ambiente inundado

Quando um solo fica submerso a água entra nos espaços antes ocupados pelo ar provocando uma série de mudanças nas suas características físicas, químicas e biológicas, que podem influenciar no crescimento das plantas. Estas mudanças dependem, sobretudo, do tempo que este solo permanecerá em submersão (Ponnamperuma, 1972). Entretanto, segundo Kozłowski e Pallardy (1984), mesmo em um solo completamente inundado, o oxigênio pode não estar totalmente ausente, pois poderá ser encontrado em concentrações consideráveis nas camadas mais superficiais da água, permitindo, desta forma, que as plantas sobrevivam nestes solos. Nestas condições de solo inundados, a difusão do oxigênio se torna muito menor, gerando uma diminuição das concentrações de oxigênio prontamente disponíveis para as plantas. Como consequência, manifesta-se uma série de distúrbios no metabolismo das plantas, através de alterações no desenvolvimento e crescimento das plantas (Pelacani, 1992).

Algumas espécies são capazes de sobreviver e crescer por algum tempo em níveis baixos de oxigênio. Particularmente, o ingá (Botelho, 1996) apresenta alterações adaptativas, como formação de raízes adventícias e lenticelas hipertrofiadas ou entumecidas, as quais possibilitam o transporte e o armazenamento de oxigênio para as partes submersas da planta (Atwell, Drew e Jackson, 1988; Burdick e Mendelssohn, 1990 e Scott et al., 1989).

Botelho (1996) mostrou, em seu trabalho, que esta espécie, quando submetida a submersão do sistema radicular, apresentou modificações anatômicas e morfológicas para se adaptar ao estresse enquanto que em plantas totalmente submersas não observou estas alterações.

Pelacani (1992) e Botelho (1996) mostraram em seus trabalhos que o crescimento desta espécie não foi afetado com a submersão do sistema radicular. Contudo, quando essa planta foi submetida a submersão total estas apresentaram paralisação do crescimento. Este comportamento, segundo Botelho (1996), pode representar uma estratégia decisiva para a sobrevivência destas plantas durante um grande período de submersão.

2.2. Metabolismo do carbono em plantas sob baixa disponibilidade de oxigênio

2.2.1. Fotossíntese

O processo fotossintético pode ser afetado de diversas formas em consequência da hipoxia ou anoxia (Pezeshki, Pardue e DeLaune, 1996).

Um dos fatores que têm sido relacionados com o declínio da atividade fotossintética nas plantas em condições de deficiência de oxigênio, segundo Allen, Pezeshki, e Chambers (1996), é a falta de energia que deveria ser fornecida pela fase fotoquímica da fotossíntese. Isto tem sido freqüentemente atribuído à diminuição da concentração de clorofila que pode ser relacionada com a sua degradação e diminuição de sua síntese (Akilan et al., 1997; Sun et al., 1995; Huang et al., 1994; Pezeshki, Pardue e DeLaune, 1996; Sena Gomes e Kozlowski, 1988 e Kozlowski e Pallardy, 1984).

Segundo Oliveira (1995), a diminuição das reações em cloroplastídeos, faz com que o fotossistema II (PSII) forneça baixa energia para os processos. Desta forma, o comportamento da eficiência dos fotossistemas pode mostrar uma condição de estresse da planta e este fator pode ser facilmente analisado, segundo Schreiber et al. (1997), pelo fluxo de elétrons e pela fluorescência.

Além dos efeitos negativos do alagamento na etapa fotoquímica da fotossíntese, verifica-se que este estresse também influencia a etapa bioquímica por afetar o processo de abertura e fechamento de estômatos (Kozlowski e Pallardy, 1984; Akilan et al. 1997; Jackson e Hall, 1987; Pallas e Kays, 1982; Else et al. 1995b; Pezeshki, 1994; Kramer e Boyer 1995 e Allen, Pezeshki, e Chambers, 1996).

Segundo Pelacani (1992), plantas de ingá mostraram que os estômatos fecharam-se nas plantas que tiveram seus sistemas radiculares submersos, desde a sua primeira avaliação aos 15 dias após a indução do tratamento em questão.

Segundo Kozlowski e Pallardy (1984), o alagamento pode levar à diminuição de energia no sistema ou a desestruturação de enzimas provocando alterações na fixação e redução do carbono. Neste caso, Huang et al. (1994) detectaram que a fotossíntese em plantas de *Triticum aestivum* submetidas a condições de alagamento do sistema radicular apresentam um declínio na sua atividade, relacionado a inibição de enzimas de fixação e redução do carbono.

De acordo com Allen, Pezeshki, e Chambers (1996) e Vu e Yelonosky (1991), a inibição da atividade da Rubisco foi o principal fator de decréscimo na fotossíntese em plantas submetidas a condições mínimas de oxigênio.

2.2.2. Respiração

A concentração de oxigênio no meio define a intensidade de uma série de processos, entre eles respiração aeróbica e a biossíntese de polipeptídeos anaeróbicos (ANPs) como lactato desidrogenase (LDH), piruvato descarboxilase (PDC), álcool desidrogenase (ADH), dentre outros polipeptídeos que têm sua síntese relacionada a baixas concentrações de oxigênio (VanToai, Fausey e McDonald, 1988; Scott et al., 1989; Drew et al., 1994; Fox, Kennedy e Rumpho, 1994; Else et al., 1995a e Crawford e Braendle, 1996). Nestas condições, com a ausência de oxigênio, a respiração aeróbica é interrompida, pela falta de aceptor de elétrons, iniciando as vias anaeróbicas ou ciclos fermentativos. Estas vias são as únicas fontes de energia para atender à demanda metabólica nestas plantas, resultando em um declínio na geração de ATP (Fox, Kennedy e Rumpho, 1994 e Kennedy, Rumpho e Fox, 1992).

2.3. Metabolismo do nitrogênio em plantas sob baixa disponibilidade de oxigênio

Em seu trabalho, Fox, Kennedy e Rumpho (1994) demonstraram que alguns organismos possuem modificações no sistema de transporte de elétrons, tornando-se capazes de reduzir, na ausência de oxigênio, um aceptor de elétrons alternativo como o nitrato (NO_3^-), fazendo com que a redutase do nitrato possa assumir importante papel de produção de energia para a célula nesta condição de privação de oxigênio.

A redutase do nitrato (RN) é uma enzima que catalisa o primeiro passo na redução do nitrogênio (N-NO_3^+) a aminoácido, no que é imprescindível a sua

atividade. Entretanto, várias pesquisas têm demonstrado que com a diminuição do oxigênio disponível pode haver um decréscimo na atividade da RN, o que foi constatado por Pelacani (1992) e Kemp e Small (1993). Segundo Mattana et al. (1994), este declínio pode ser devido sobretudo a diminuição da síntese “de novo” desta enzima.

Em condições de falta de oxigênio, há um bloqueio no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O íon nitrato que em geral é a principal fonte de nitrogênio, pode passar a ter função especial, pela possibilidade de ser utilizado como aceptor final de elétrons, dependendo de NADH para fazer a redução do nitrato para o nitrito (Reggiani, Branbilla e Bertani, 1985). Assim, a atividade da redutase do nitrato (RN) na chamada “respiração do nitrato” pode representar uma maior regeneração do poder redutor NAD^+ , já que a RN não tem ação competitiva de poder redutor com as enzimas lactato desidrogenase e álcool desidrogenase, contribuindo, desta forma, para maior intensidade e continuação da glicólise (Reggiani Branbilla e Bertani, 1985; Saglio, Drew e Pradet, 1988; Mattana et al., 1994 e Kemp e Small, 1993).

Nas condições de inundação, a conversão do nitrito à amônia, também pode ser fortemente afetada pela diminuição da carga energética, indicando que as atividades das enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) também podem assumir papel importante na assimilação de nitrogênio, na forma amoniacal (Botelho, 1996).

A atividade da GS pode ser afetada com a diminuição da energia na planta, pois esta enzima requer alta carga energética para completar a reação de glutamato para glutamina (Reggiani Branbilla e Bertani, 1985 e Mattana et al., 1994). Em seu trabalho com coleóptiles de arroz em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, Reggiani et al. (1993) encontraram que a glutamato

desidrogenase (GDH) apresentou maior atividade que as enzimas GS e GOGAT na fixação do nitrogênio amoniacal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho contou com a realização de dois experimentos, um em condições de viveiro na área experimental do setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia (DBI) na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o outro em condições de campo em uma área sujeita ao deplecionamento de água às margens do reservatório hidrelétrico da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) em Camargos, Itutinga - MG.

A espécie utilizada em ambos os experimentos foi o ingá (*Ingá vera* Willd.), conhecida pelo nome popular de ingazeira.

3.1. Condução dos experimentos

3.1.1. Experimento em condições de viveiro

No experimento realizado no setor de Fisiologia Vegetal no DBI-UFLA, utilizaram-se mudas de ingá cultivadas em vasos, com a submersão destas mudas ocorrendo por um período de 49 dias.

As mudas foram produzidas a partir de sementes coletadas às margens do Rio Grande - MG, e selecionadas seguindo critérios como uniformidade, altura de plantas, número de folhas, lançamento foliares novos, bem como estado fitossanitário.

Estas mudas foram transplantadas de sacos plásticos (25x10) para vasos com capacidade de 5 litros. O substrato utilizado nestes vasos foi terra de barranco adubada, seguindo as recomendações para uso de corretivos e

fertilizantes em Minas Gerais, 4ª aproximação para plantio de mudas florestais, sendo que todo nitrogênio fornecido estava na forma nítrica.

Neste experimento aplicaram-se 3 tratamentos, o cultivo sem submersão, o cultivo com submersão do sistema radicular e o cultivo com submersão total das plantas. A submersão do sistema radicular foi determinada com base na altura dos vasos, enquanto que no tratamento com submersão total das mudas os tanques permaneceram completamente cheios. O solo dos vasos contendo as mudas do tratamento sem submersão foi mantido próximo à capacidade de campo.

Para aplicar os tratamentos a estas mudas, elas foram transferidas para tanques de alvenaria de 3 metros de comprimento, 1 metro de largura e 0,6 metro de profundidade, cobertos por um sombrite que interceptava 30% da energia luminosa solar incidente.

Avaliou-se o efeito do tratamento e do tempo a que as plantas foram submetidas a eles. Para tanto, em cada avaliação foram utilizadas 4 mudas e cada muda uma repetição. Para as avaliações de crescimento utilizaram-se 8 repetições. Os dados obtidos a partir das observações foram analisados estatisticamente em DBC, ao nível de 5% de significância para o teste de Tuckey.

Neste experimento foram observadas as seguintes características: crescimento em altura e diâmetro na altura do coleto das plantas, observadas aos 0, 15, 34 e 49 dias após a indução dos tratamentos; crescimento da área foliolar e comprimento da ráquis, observadas aos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 15 dias após a indução dos tratamentos (D.A.I.T.); as trocas gasosas utilizando o analisador de gás infravermelho e a eficiência do fotossistema II (PSII) através do analisador de eficiência de plantas, mensuradas aos 4, 8, 12, 15, 20, 26, 31, 34, 38, 42 e 49 D.A.I.T.; e ainda fotossíntese potencial, conteúdo de clorofila, teor de carboidratos, teor de proteínas, atividade das enzimas álcool desidrogenase

(ADH), lactato desidrogenase (LDH), redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamina oxoglutarato aminotransferase dependente de ferredoxina (fd-GOGAT), que foram quantificados nos desmontes periódicos aos 15, 34 e 49 D.A.I.T.

3.1.2. Experimento em condições de campo

O experimento em condições de campo foi realizado numa área de depleção às margens do reservatório hidrelétrico de Camargos, e foram estudadas plantas com 4 anos de idade, oriundas de um plantio experimental dessa espécie, que estavam sujeitas a diferentes alturas de submersão.

A submersão das plantas foi causada pela elevação natural do nível da água (enchimento) do reservatório ao longo do ano. As avaliações foram feitas nas seguintes datas: 07/09/1997, 28/09/1997 e 06/10/1997.

3.1.2.1. Caracterização da área de campo

O reservatório de Camargos pode apresentar um deplecionamento máximo de cerca de 7 metros que corresponde à variação da coluna de água entre o nível mais alto e o nível mais baixo.

As plantas avaliadas estavam plantadas em linhas dispostas em curva de nível. Conforme a variação do nível de água no reservatório durante o período de novembro de 96 a novembro de 97 as plantas sofreram diferentes alturas e tempos de submersões. As linhas de plantio contendo as plantas estavam localizadas em 4 (quatro) cotas: Linha a (853,5 metros), linha b (852,3 metros), linha c (851,3 metros) e linha d (850,8 metros) com base no nível de referência do local da barragem do reservatório (Figura 1).

As plantas da linha de plantio a, localizada na cota mais alta apresentavam alturas variando entre 3 e 4 metros; nas outras linhas de plantio (b, c e d), as plantas apresentavam aproximadamente 1 metro de altura (Figura 1).

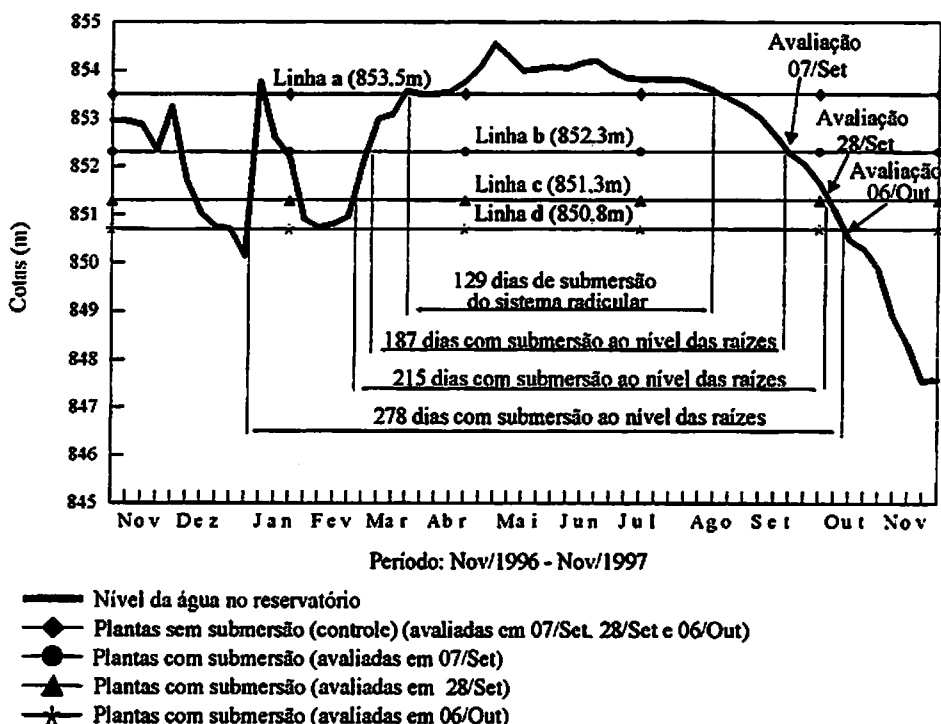


Figura 1. Variação semanal (7 dias) do nível da água (cotas) do reservatório hidrelétrico de Camargos (Itutinga - MG) no período de 04/11/96 a 27/11/97. As linhas horizontais na figura indicam as cotas/linhas de plantio das plantas avaliadas.

Quando o reservatório atingiu seu nível mais alto no ano de 1997, a água cobria totalmente as plantas das três linhas de plantio/cotas mais baixas (linhas b, c e d). Já a linha de plantio/cotas mais alta deste experimento, no momento da primeira avaliação, as plantas encontravam-se com submersão apenas do sistema radicular (Figura 1).

Devido as linhas de plantio estarem em cotas diferentes o tempo de submersão das plantas foi maior nas linhas de plantio mais baixas conforme se observa na Figura 1.

As avaliações das plantas do tratamento “sem submersão” (controle) foram feitas na linha a, em todas as épocas de avaliação (07/Set, 28/Set e 06/Out). Nesta linha, a água do reservatório não submergiu totalmente as plantas, atingindo somente 1 metro dos caules, que permaneceram 129 dias nesta condição. Essas plantas utilizadas como controle passaram por um período de aproximadamente 30 dias sem submersão antes de serem submetidas a primeira avaliação.

As plantas nas demais linhas foram consideradas como tratamento “com submersão”. As plantas da linha b, passaram por um período de submersão total de cerca de 187 dias e tiveram uma coluna de água máxima sobre as mesmas de cerca de 1,2 metros e foram avaliadas em 07/Set. As plantas da linha c, passaram por um período de submersão total de cerca de 215 dias e tiveram uma coluna de água no ponto máximo da cheia do reservatório de cerca de 2,2 metros e foram avaliadas em 28/Set. As plantas na linha d passaram por um período de submersão total de cerca de 278 dias, e a coluna de água acima da planta chegou ao máximo de 2,7 metros e foram avaliadas em 06/Out/ (Figura 1).

3.1.2.2. Avaliações na área do reservatório de Camargos

Neste experimento foram avaliados os efeitos causados pelos diferentes tempos de submersão total a que a planta foi submetida.

Observaram-se dois tratamentos: o sem submersão e o com submersão total, que foram avaliados em diferentes tempos. Para cada uma foram utilizadas 5 plantas, cada planta representando uma repetição, e em cada uma destas fez-se duas amostragens. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente em DBC, ao nível de 5% de significância para o teste de Tuckey.

Em todas as datas de avaliação, a linha mais alta em relação ao nível da água (linha a) representou o tratamento sem submersão, ressaltando que as

plantas passaram 129 dias com submersão do sistema radicular e estas plantas apresentavam-se há, aproximadamente, 30, 51 e 59 dias sem água nas bases de seus caules na primeira, segunda e terceira épocas de avaliação, respectivamente (Figura 1).

Na primeira avaliação, as plantas na segunda linha de plantio com o nível mais alto (linha b) foram avaliadas como o tratamento com submersão, tendo passado 166 dias totalmente submersas e 5 dias com submersão de parte das plantas até a data da avaliação, nesta linha de plantio (Figura 1).

Na segunda data de avaliação, as plantas observadas representando o tratamento com submersão encontravam-se na terceira linha de plantio com nível mais alto (linha c). Dentre as que foram avaliadas, as plantas situadas nesta linha passaram por um período de submersão total de 203 dias e 7 dias com submersão de parte da planta até a data de avaliação (Figura 1).

Na terceira e última avaliação utilizou-se, dentre as linhas avaliadas, para o tratamento com submersão, aquelas de plantio no nível mais baixo, que estavam na linha d. As plantas nesta linha passaram 271 dias totalmente submersas e 3 dias com submersão de parte destas plantas até a época de avaliação.

Neste experimento foram quantificadas as seguintes características: as trocas gasosas, eficiência do fotossistema II, teor de carboidratos, teor de proteínas, atividade das enzimas ADH, LDH, RN, GS, fd-GOGAT. Estas avaliações foram feitas em materiais coletados nas datas de 07/09, 28/09 e 06/10/1997, que corresponderam a 166, 203 e 271 dias de submersão total das plantas, respectivamente.

Neste experimento avaliou-se apenas tecido foliar; no tratamento com submersão, este tecido, no momento das avaliações, já não se encontrava mais em submersão, ficando fora destas condições por 5, 7 e 3 dias antes da primeira, segunda e terceira avaliações respectivamente.

3.2. Material vegetal analisado

No experimento com plantas cultivadas em vaso, as folhas observadas para determinar o crescimento foliar eram lançamentos foliares novos, selecionados e marcados antes da indução dos tratamentos. Para avaliação desta característica, foram selecionados 8 lançamentos foliares em cada tratamento. A altura das plantas e diâmetro do caule foram quantificados nas mesmas plantas em que se observou o crescimento foliar. As folhas nas quais se quantificou trocas gasosas, eficiência do fotossistema II e teor de clorofila foram também previamente selecionadas e, para estas últimas avaliações, utilizou-se como critério a escolha de folhas que se encontravam completamente expandidas no início do experimento. Para avaliação desta característica foram selecionadas uma folha em cada planta.

As análises bioquímicas foram determinadas utilizando-se folhas completamente expandidas, as mesmas utilizadas para a determinação das trocas gasosas. O tecido radicular que foi utilizado para as avaliações no laboratório foi selecionado observando-se critérios como espessura, escolha de raízes finas, e degradação, e coletando-os de vários pontos da raiz.

Neste experimento em condições de viveiro, para determinar a fotossíntese líquida e eficiência dos fotossistemas nas plantas submetidas ao tratamento totalmente submerso, elas tiveram sua parte aérea retirada da submersão por 5 a 10 minutos até que as folhas secassem e fosse possível quantificar tais características.

No experimento em condições de campo, às margens do reservatório de Camargos, em todas as avaliações as folhas selecionadas para os estudos encontravam-se completamente expandidas. Procurou-se utilizar folhas que

tinham sua emissão no começo do ano de 1997, não sendo observado o tecido radicular das plantas neste experimento.

3.3. Características avaliadas

3.3.1. Características de crescimento

O crescimento em alturas das plantas foi medido do coleto na altura do vaso até o ápice; o crescimento secundário (crescimento do diâmetro do caule) foi medido na região do coleto (altura da borda do vaso). Estas avaliações foram feitas aos 0, 15, 34 e 49 dias após a indução dos tratamentos (D.A.I.T.), apenas no experimento em condições de viveiro.

O crescimento dos folíolos foi medido determinando-se o crescimento da sua área através de um coeficiente de transformação, o qual utilizava como área real a tirada por um medidor de área foliar. Este coeficiente obtido a partir da área real, multiplicação dos valores de comprimento e largura do folíolo. O comprimento da ráquis foliar foi quantificado a partir do final do pecíolo até o outro ponto extremo da ráquis. Estas avaliações foram mantidas até as folhas tornarem-se completamente expandidas e foram feitas nos seguintes tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 15 D.A.I.T.

3.3.2. Trocas gasosas

Foi utilizado o analisador de gás por infravermelho (IRGA), sistema aberto, portátil, modelo LCA-4 (Hoddesdon, UK) para medir as trocas gasosas em folhas intactas de ingazeira. As características avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (FS), concentração subestomática de CO_2 (Ci), condutância estomática (CE) e transpiração (T). A eficiência de carboxilação e a eficiência no uso da água instantânea (EUA) foram dadas pelas relações FS/Ci e FS/T , respectivamente. A eficiência no uso da água (EUA) é considerada instantânea quando refere-se a relação entre fluxos líquidos de CO_2 e vapor d'água (Lindroth e Cienciala, 1996). Todas as avaliações foram realizadas em dias claros às 12:00 horas, horário solar, sendo que as folhas escolhidas estavam completamente expandidas e sempre com suas faces adaxiais voltadas aos raios solares.

3.3.3. Fotossíntese potencial

A fotossíntese potencial foi determinada utilizando-se uma câmara de Clark de fase gasosa (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 utilizada por Delieu e Walker (1983) com alterações: solução de KCl $\frac{1}{4}$ da saturação, NaHCO_3 a 1 molar. A estabilização do aparelho foi a rápida; os valores foram obtidos com auxílio de um microcomputador e o programa Leafdisc fornecido pela Hansatech. A iluminação foi feita utilizando-se um retroprojektor que fornecia aproximadamente

900 $\mu\text{moles.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons para dentro da câmara. O disco foliar tinha 2,5 cm^2 . Foram evitadas as nervuras principais.

3.3.4. Fluorescência

A eficiência fotoquímica do fotossistema II foi avaliada utilizando-se o fluorômetro PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK), sendo que, antes das medições, os folíolos foram adaptados ao escuro durante 30 minutos com auxílio de cliques foliares. A intensidade de luz selecionada no sensor foi de 60% da capacidade total do aparelho durante 5 segundos em cada leitura. Foram mensuradas as variáveis de fluorescência: F_o , F_m e F_v ($F_m - F_o$), sendo utilizada, para as análises de eficiência fotoquímica, a relação F_v/F_m . Os folíolos e horário de avaliação destes dados foram selecionados seguindo o mesmo critério utilizado nas trocas gasosas.

3.3.5. Clorofila a, b e total

Para determinar o teor de clorofilas a, b e total foram coletadas folhas das quais se retirou discos foliares de 2,5 cm^2 , e foram maceradas em graal com 3mL de acetona 80%, e completando-se até 8mL e centrifugou-se a 10000g por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e feitas as leituras nas absorvâncias a 663nm e 645nm, para clorofila a e b, respectivamente, procedendo-se os seguintes cálculos para determinar o teor das clorofilas: $12,7 \times A_{663\text{nm}} - 2,69 \times A_{645\text{nm}}$ para clorofila a; $22,9 \times A_{645\text{nm}} - 4,28 \times A_{663\text{nm}}$ para clorofila b; e $8,02 \times A_{663\text{nm}} + 20,2 \times A_{645\text{nm}}$ para clorofila total (Holden, 1976).

3.3.6. Atividades enzimáticas

3.3.6.1. Preparo do material

As análises bioquímicas foram realizadas em extratos de lâminas foliares e raízes de ingá. No experimento de campo utilizou-se apenas tecido foliar.

As folhas utilizadas foram as mesmas selecionadas para as avaliações fotossintéticas (trocas gasosas e eficiência do fotossistema II). Este material, após a coleta, foi transportado até o laboratório, onde seguiram-se 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.

Para a determinação da atividade da redutase do nitrato "*in vivo*" foram pesados 500mg de ambos os tecidos que foram cortados em porções de aproximadamente 3mm colocados em um recipiente com tampão de incubação (tampão fosfato de potássio 0,1M, 1% de n-propanol e KNO_3 a 100mM) para mensuração da atividade da redutase do nitrato "*in vivo*".

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

3.3.6.2. Obtenção dos extratos enzimáticos

O extrato enzimático bruto foi obtido através da homogeneização das amostras de tecido vegetal, em 5mL de um meio de extração composto de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 (4,82mL), CaCl_2 6H₂O 0,5M (100μL), EDTA

0,1M (50 μ L), DTT 1,0M (10 μ L), PMSF 0,4M (10 μ L) e PVPP (100 mg). Seguiu-se uma centrifugação a 30.000g durante 10 minutos a 4°C. Para as amostras oriundas do experimento em condições de campo no reservatório de Camargos, a homogeneização se deu por maceração em graal, e para o material do experimento em condições de viveiro com plantas cultivadas em vaso, através de trituração em um microtritador (TECNAL). Esta alteração no processo de homogeneização objetivou maior agilidade durante a obtenção dos extratos enzimáticos. Em ambos os casos, procurou-se manter a temperatura próxima de 4°C.

Os extratos obtidos foram armazenados até serem utilizados para os ensaios enzimáticos da álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, glutamina sintetase e glutamato sintase dependente da ferredoxina. Os açúcares redutores, açúcares solúveis totais e as proteínas também foram quantificadas utilizando-se este extrato.

Os extratos brutos para estas análises bioquímicas foram obtidos dos materiais coletados aos 15, 34 e 49 D.A.I.T..

3.3.6.3. Ensaio da redutase do nitrato

A atividade da redutase do nitrato foi determinada nas raízes e lâminas foliares das plantas pela análise "in vivo". Para isso pesou-se 500mg do tecido foliar ou da raiz, transferindo-os para bekers de 20mL contendo meio de incubação composto de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5; n-propanol a 1% (v/v) e KNO₃ a 0,1M de concentração final. Este material foi submetido a vácuo por 2 minutos para a infiltração do meio no tecido, após este procedimento os recipientes foram colocados em banho-maria com agitação. Após 30 minutos de incubação, foram retiradas alíquotas de 1mL as quais se adicionou 1mL de

sulfanilamida a 1% em HCl 1,5N, 1mL de N-2-naftil etileno, completando-se o volume para 4mL com água destilada. A leitura das absorvâncias foram no comprimento de 540nm. Esta avaliação foi feita aos 15, 34 e 49 D.A.I.T..

3.3.6.4. Ensaio da glutamina sintetase

Para o ensaio da GS, foram adicionados 200 μ L do extrato enzimático, a 800mL do meio de reação composto de tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5 (300 μ L), mercaptoetanol 0,1M (100 μ L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4M (50 μ L), $NH_2OH \cdot HCl$ 0,1M (150 μ L), glutamato monossódico 0,5M (100 μ L) e ATP 0,1M (100 μ L). Incubou-se a mistura durante 15 minutos a 30°C. A reação foi paralisada pela adição de 1,0mL de uma solução contendo $FeCl_3$ 0,37M, HCl 0,67M e TCA 0,2M. O quelato Fe-L-glutamil- γ -hidroxamato (GHA) produzido foi determinado em espectrofotômetro a 540nm.

3.3.6.5. Ensaio da glutamato sintase dependente da ferredoxina

Para o ensaio da Fd-GOGAT, foram adicionados 200 μ L do extrato enzimático em 1300 μ L do meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 0,5M pH 7,5 (500 μ L), glutamina 0,1M (150 μ L), 2-oxoglutarato 0,1M (150 μ L) e metil viologênio 2mg.mL⁻¹ (200 μ L). O meio de reação e o extrato foram incubados por 2 minutos a 30°C, e a reação foi iniciada com a adição de 300 μ L da mistura de 16 mg $Na_2S_2O_4$, 16mg $NaHCO_3$ e 1,0mL de água destilada. Este meio foi levado para estabilização em banho-maria a 30°C por 20 minutos, paralisando-se a reação com a imersão dos tubos de ensaio em água a 90°C durante 2 minutos e, imediatamente, agitado em vórtex até o desaparecimento total da cor azul e resfriamento em gelo.

Em seguida, retiraram-se alíquotas de 1,0mL de cada amostra, aplicadas em coluna Dowex na forma acética. Após a lavagem da coluna com 15mL de água destilada, foram utilizados 7mL de ácido acético 300mM para eluir o glutamato que estava retido na coluna. Este volume foi coletado em beakers, dos quais foram retirados alíquotas de 1,0mL para reagir com 2,0mL de uma solução constituída de 0,4g ninhidrina, 1g de CdCl_2 , 80mL de etanol, 10mL de ácido acético e 20mL de água destilada.

Em seguida, esta mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada por 10 minutos a 80°C com agitação, sendo posteriormente resfriada em gelo. A quantidade de glutamato formada foi determinada em espectrofotômetro a 506nm.

3.3.6.6. Ensaio da álcool desidrogenase

Para o ensaio da ADH, foram adicionados 100 μL do extrato enzimático, em 2,7mL do meio de reação composto de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,9 e DTT 2mM, 100 μL de etanol e 100 μL de NAD^+ 7,5mM e, incubou-se a mistura durante 15 minutos à 30°C . O $\text{NADH}+\text{H}$ produzido foi determinado em espectrofotômetro a 340nm.

3.3.6.7. Ensaio da lactato desidrogenase

Para o ensaio da LDH foram adicionados 100 μL do extrato enzimático, em 2,7mL do meio de reação composto de tampão Tris-HCL 50mM pH 8,9, glicina 0,1mM, sulfato de hidrazina 100mM e 0,1 μL de lactato de sódio e 100 μL de NAD^+ 7,5mM e incubou-se a mistura durante 15 minutos à 30°C . O $\text{NADH}+\text{H}$ produzido foi determinado em espectrofotômetro a 340nm.

3.3.7. Açúcares solúveis totais

O teor de açúcares solúveis totais foi dosado segundo a metodologia descrita por Yemm e Willis (1954). Para tanto, adicionou-se 100µL do extrato em 950µL de água destilada e 2,0mL do reagente antrona, composto de 20mg de antrona, 0,5mL de H₂O e 10mL de H₂SO₄ concentrado. Após agitação, os tubos foram levados para aquecimento a 100°C por 5 minutos. A quantificação dos açúcares solúveis foi determinada em espectrofotômetro a 620nm, baseada na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

3.3.8. 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 100µL do extrato bruto, sendo adicionados 1400µL de água destilada e 1000µL do reagente DNS. Esta mistura foi homogeneizada e levada ao banho-maria por 5 minutos a 100°C, sendo posteriormente resfriada à temperatura ambiente. A quantificação dos açúcares redutores foi determinada em espectrofotômetro a 540nm, baseada na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glicose.

3.3.9. Amido

A quantificação do amido foi realizada apenas no material coletado nas plantas cultivadas em vaso, utilizando-se as mesmas amostras em que se obtiveram os extratos enzimáticos.

Após os processos de homogeneização e centrifugação do tecido vegetal já descritos anteriormente para a obtenção dos extratos brutos, o pelete resultante foi ressuspensão em 4mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) e submetido a centrifugação a 10.000g durante 20 minutos numa temperatura de 10°C. Esta operação repetiu-se por duas vezes, descartando-se os sobrenadantes. O resíduo do TCA foi, finalmente, ressuspensão em ácido perclórico 30% e centrifugado a 10.000g durante 30 minutos numa temperatura de 20°C. A quantificação do amido foi realizada no sobrenadante resultante desta centrifugação, no qual empregou-se a metodologia descrita para açúcares solúveis, sendo utilizadas alíquotas de 200µL deste extrato. Esta avaliação foi feita somente nas plantas cultivadas em vasos.

3.3.10. Proteínas

A determinação de proteínas ocorreu pelo método de Bradford nos mesmos extratos brutos utilizados nos ensaios enzimáticos. As alíquotas foram de 300µL dos extratos e 1mL 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 homogeneizadas em vórtex e levadas para leitura em espectrofotômetro a 595nm, sendo os valores foram expressos com base na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de soro-albumina bovina (BSA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento da planta

No experimento com mudas cultivadas em vaso, o alagamento total afetou o desenvolvimento das plantas reduzindo a altura (Figura 2a), a área do folíolo (Figura. 2b), o diâmetro do caule (Figura 2c) e o comprimento da ráquis foliar (Figura 2d). Por outro lado, a submersão apenas do sistema radicular, não afetou estas características. Dentre as características estudadas, o diâmetro do caule, a área do folíolo e o comprimento da ráquis foram as mais afetadas pela completa submersão das plantas, pois seu crescimento ficou praticamente paralisado, durante o período estudado. A altura da planta experimentou um aumento no crescimento durante os primeiros 15 dias mas, a partir daí, e a exemplo das outras características estudadas, parou de crescer.

Deve-se ressaltar ainda que as plantas de ingá apresentaram algumas adaptações morfológicas como a produção de lenticelas entumecidas aos 8 dias após a indução dos tratamentos (D.A.I.T.) e a formação de raízes adventícias aos 15 D.A.I.T., o que está de acordo com o descrito por Botelho (1996).

Ainda para Botelho (1996) trabalhando com a mesma espécie, apresentou uma curva de crescimento do folíolo com uma tendência muito parecida à observada no presente trabalho. Os resultados obtidos também estão de acordo com os obtidos por Pelacani (1992), com exceção da altura de plantas em que a autora observou um menor crescimento de plantas quando foram submetidas a submersão do sistema radicular.

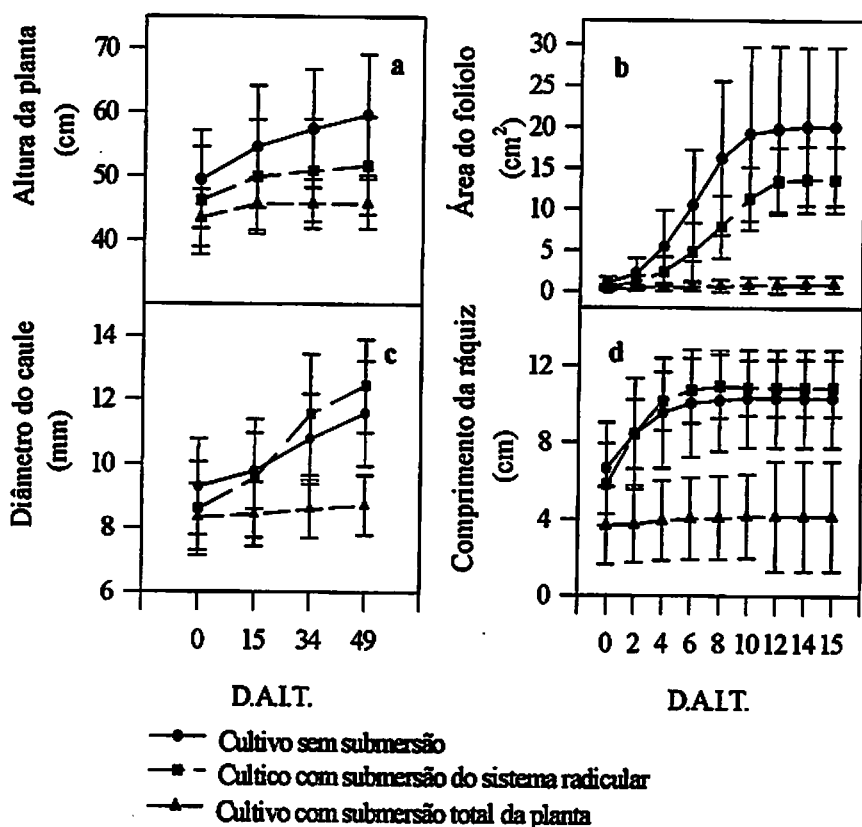


FIGURA 2. Altura da planta (a), área do folíolo (b), diâmetro do caule (c) e comprimento da ráquis (d) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras representam o valor médio de oito repetições e o erro padrão da média.

O reflexo do menor crescimento das plantas totalmente submersas desta espécie pode ser claramente observado em áreas sujeitas a inundação às margens do reservatório de Camargos, onde as plantas que ficam sujeitas a maiores períodos de submersão, apresentam-se menores que aquelas não submersas ou submersas por um menor período.

4.2. Trocas gasosas, eficiência fotoquímica e conteúdo de clorofila

De maneira geral, no experimento com mudas cultivadas em viveiro, a fotossíntese líquida das plantas sem submersão foi maior que aquela verificada nas plantas sob alagamento parcial ou total (Figura 3a). Até o 26º dia não foram verificadas diferenças entre a fotossíntese das plantas com o sistema radicular submerso e a daquelas totalmente alagadas. A partir daí, até o 38º dia, a submersão do sistema radicular provocou um decréscimo na fotossíntese, com a posterior recuperação, após o 42º dia.

A condutância estomática das mudas cultivadas em viveiro sem submersão foi superior a das outras plantas até o 34º dia, vindo, a partir daí, a igualar-se com a dos demais tratamentos (Figura 3b). Por outro lado, praticamente não se observaram diferenças entre a condutância das plantas com submersão total daquelas que tiveram apenas o sistema radicular alagado. A transpiração (Figura 3c) seguiu o mesmo padrão do comportamento estomático, observando-se uma maior transpiração no período de maior abertura dos estômatos.

A submersão das plantas do experimento realizada em condições de campo no reservatório de Camargos, a exemplo das plantas cultivadas em viveiro, provocou um decréscimo na fotossíntese em todas as épocas de avaliação

(Figura 4a). Por outro lado, a condutância estomática (Figura 4b) e a transpiração (Figura 4c) não foram afetadas pelo alagamento, o que está de acordo com vários autores que relacionam o estresse gasoso, provocado pelo alagamento, como um fator limitante da fotossíntese das plantas que se encontram em condições de submersão (Laan e Blom 1990; Vu e Yelenosky, 1991; Daugherty e Musgrave, 1994; Sun et al., 1995; Pezeshki, Pardue e DeLaune, 1996; Allen, Pezeshki, e Chambers, 1996 e Gravatt e Kirby, 1998). Segundo Huang et al. (1994), nestas condições, o decréscimo na fotossíntese está ligado ao fechamento dos estômatos. Entretanto, tem sido verificado somente um pequeno efeito do alagamento na condutância estomática, especialmente em plantas tolerantes a este tipo de estresse (Youssef e Saenger, 1998).

Ao contrário do que era esperado, não se verificou, para todos os tratamentos, uma alta correlação entre a fotossíntese e condutância estomática (Tabela 1 e 2), sugerindo que outros fatores devem estar regulando a fixação e a redução do carbono nestas plantas. Quick et al. (1989), por exemplo, trabalhando com trigo, mostraram que o comportamento estomático nem sempre é a causa direta das variações da fotossíntese em plantas submetidas a condições adversas. Outros fatores como a diminuição na atividade das enzimas de fixação e redução do carbono podem causar decréscimos na taxa assimilatória líquida.

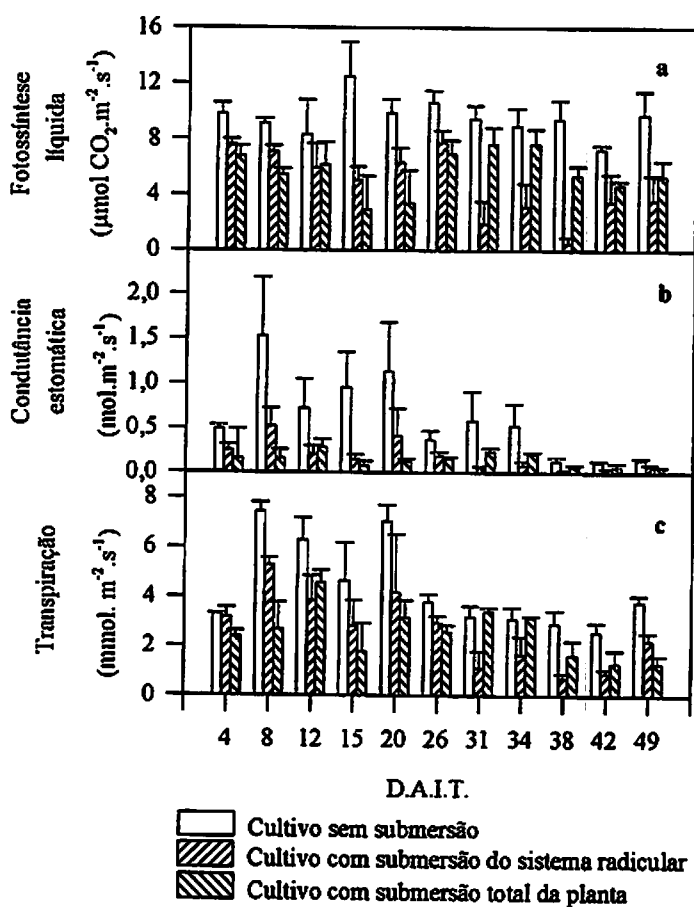


FIGURA 3. Fotossíntese líquida (a), condutância estomática (b) e transpiração (c) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras representam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

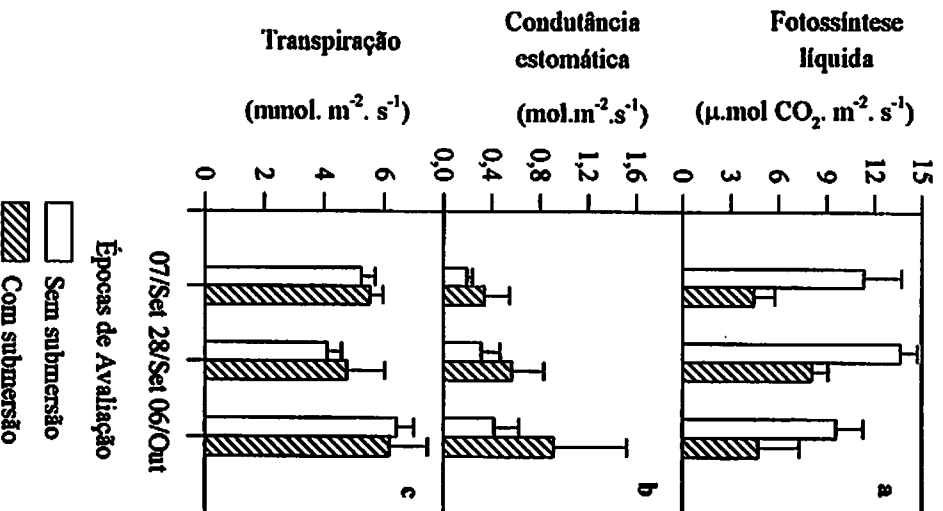


FIGURA 4. Fotossíntese líquida (a), condutância estomática (b) e transpiração (c) de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submersas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

TABELA 1. Equações das curvas e valores de r^2 para as correlações entre a fotossíntese e demais características de troca gasosa das plantas cultivadas em vasos.

	Cultivo sem submersão	Cultivo com submersão do sistema radicular	Cultivo com submersão total da planta
FS/CE	$Y=0,142x + 9,440$ $r^2=0,0052$	$Y=8,650x + 3,230$ $r^2=0,395$	$Y=12,410x + 3,910$ $r^2=0,313$
FS/T	$Y=0,161x + 8,896$ $r^2=0,027$	$Y=1,172x + 1,674$ $r^2=0,536$	$Y=0,251x + 1,072$ $r^2=0,147$
FS/EC	$Y=131,54x + 4,850$ $r^2=0,45$	$Y=245,03x + 0,240$ $r^2=0,891$	$Y=155,32x + 1,754$ $r^2=0,520$
FS/EUA	$Y=0,479x + 8,398$ $r^2=0,052$	$Y=0,866x + 3,031$ $r^2=0,133$	$Y=0,568x + 4,292$ $r^2=0,085$

TABELA 2. Equações das curvas e valores de r^2 para as correlações entre a fotossíntese e demais características de troca gasosa das plantas no campo reservatório de Camargos.

	Tratamento sem submersão	Tratamento com submersão
FS/CE	$Y=-0,5014x + 11,705$ $r^2=0,0124$	$Y=2,090x + 4,590$ $R^2=0,113$
FS/T	$Y=-0,224x + 12,65$ $r^2=0,0167$	$Y=0,280x + 4,038$ $R^2=0,064$
FS/EC	$Y=127,410x + 5,097$ $r^2=0,761$	$Y=272,73x + 0,512$ $R^2=0,952$
FS/EUA	$Y=2,131x + 6,590$ $r^2=0,461$	$Y=4,346x + 1,048$ $R^2=0,622$

*FS= fotossíntese; CE= condutância estomática; T= transpiração; EC= eficiência de carboxilação; EUA= eficiência no uso da água.

De maneira geral, a fotossíntese potencial das plantas cultivadas em vasos com o sistema radicular alagado foi menor do que a das plantas controle, diferença que se acentuou com o tempo de submersão (Figura 5). No final do experimento, verificou-se uma menor fotossíntese potencial das plantas parcialmente alagadas em relação àquelas totalmente submersas. Observa-se, então, que a fase bioquímica da fotossíntese, ou seja, a fixação e redução CO_2 passou a ser afetada pelo tempo de exposição das raízes ao alagamento. Para este tratamento foi verificada uma alta correlação entre a eficiência de carboxilação e a fotossíntese líquida (Tabela 1 e 2), o que nos permite sugerir que as enzimas dos processos de fixação e redução foram afetadas pelo tratamento.

Ainda observando as Figuras 3 e 5 pode-se notar que a fotossíntese líquida é cerca de 3 vezes menor que a fotossíntese potencial em condições normais e se analisarmos estes valores aos 49 D.A.I.T., no tratamento com submersão apenas do sistema radicular nota-se que a fotossíntese potencial apresenta os valores das duas fotossíntese semelhantes, indicando que houve efeito deste tratamento diminuindo a atividade das enzimas de fixação e redução.

Em um recente trabalho de revisão, Kozlowski (1998) relata que uma alta correlação entre fotossíntese e fechamento estomático somente pode ser verificada quando se estuda o alagamento em um curto período de tempo. Sob condições mais prolongadas, a taxa de fotossíntese é reduzida progressivamente por efeitos inibitórios no próprio processo fotossintético. Como a fotossíntese potencial não sofre influência da condutância estomática, sugere-se que os fatores que podem afetar a fotossíntese potencial são o desempenho das enzimas de fixação, a redução do carbono e a eficiência do fotossistema II (Thompson et al., 1992).

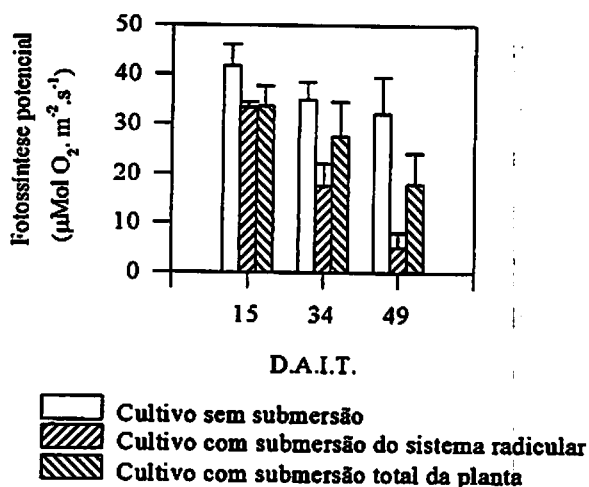


FIGURA 5. Fotossíntese potencial de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

À semelhança do que ocorreu no experimento com mudas, as plantas adultas no campo, independentemente da submersão, também apresentaram melhor correlação entre fotossíntese líquida e a eficiência de carboxilação (Tabela 2). Sun et al. (1995); Uchino et al. (1995) e Moore, Palquimist e Seeman (1997) verificaram que, durante o alagamento, há um decréscimo na eficiência de carboxilação em decorrência de uma queda na atividade das enzimas envolvidas nos processos de fixação e redução do CO₂. Vu e Yelenosky (1991), submetendo plantas de laranja a submersão do sistema radicular, mostraram que a Rubisco é a principal enzima a ser afetada.

Tendo sido destacada neste trabalho uma inibição não estomática da fotossíntese, estudou-se, além das mudanças na fixação e redução do carbono, alguns aspectos fotossintéticos associados à produção de energia. Neste caso, observa-se, pela Figura 6, que as plantas cultivadas em vasos, totalmente submersas, tiveram sua eficiência fotoquímica afetada a partir do 12º D.A.I.T., enquanto que diferenças significativas entre a eficiência fotoquímica das plantas jovens com alagamento somente nas raízes diferiu das plantas controle, apenas na última avaliação, aos 49 D.A.I.T. (Figura 6).

As plantas adultas em condições de campo submersas, às margens do reservatório de Camargos, apresentaram, em todos os períodos estudados, uma menor eficiência do fotossistema II quando comparadas àquelas que não estavam submersas (Figura 7).

A eficiência do fotossistema II das plantas parcialmente alagadas foi em média, superior àquela verificada nas plantas totalmente alagadas (Figura 6), embora esta maior eficiência não foi refletida numa maior fotossíntese potencial (Figura 5). Tais resultados sugerem que a disponibilidade de energia e poder redutor para as plantas, em todos os tratamentos, estava em nível adequado, já que a fotossíntese potencial das plantas com submersão total foi semelhante àquela verificada nas plantas controle. A menor fotossíntese potencial das plantas com submersão do sistema radicular não está, desta forma, ligada a danos no aparato fotoquímico ou a uma menor disponibilidade de produtos da fase fotoquímica e sim a aspectos ligados à fixação e redução do carbono.

Decréscimos na eficiência do fotossistema II estão comumente associados a baixos teores de clorofila. Neste trabalho verificou-se que plantas total ou parcialmente submersas apresentaram um menor teor de clorofila em relação às plantas controle já nos primeiros 15 dias de submersão (Figura 8). Esta queda foi gradual, chegando a diminuir em aproximadamente 80% e 65% nos tratamentos

totalmente e parcialmente submersas, respectivamente, em relação ao controle nos 49 D.A.I.T.. Outro fato que deve ser ressaltado é que percebeu-se a clorose apenas nas plantas com submersão do sistema radicular aos 42 D.A.I.T., permanecendo as plantas totalmente submersas sem sintomas de clorose.

Na literatura, os dados indicam mais de uma causa para essa diminuição nos teores de clorofila. Daugherty e Musgrave (1994) e Huang et al. (1994), por exemplo, sugerem que a clorose das folhas de plantas em condições de alagamento se deve a alta taxa de degradação das clorofilas. Por outro lado, Daugherty e Musgrave (1994) e Sena Gomes e Kozłowski (1988) apontam a baixa taxa de síntese de clorofila, sob condições de alagamento do sistema radicular, como consequência da síntese de etileno.

O relacionamento entre os processos de perda de água (transpiração) e a fotossíntese líquida, aqui representado pela eficiência no uso da água (EUA) em plantas cultivadas em vasos, não apresentou um padrão de resposta que permitisse uma associação entre os tratamentos e as trocas gasosas (Figura 9). Por outro lado, a EUA em plantas que passaram por um período de submersão na região de Camargos foi menor que nas plantas sem submersão (Figura 10), em consequência da queda na atividade fotossintética destas plantas (Figura 3), já que a transpiração não foi alterada, como mostram as Figuras 3 e 4.

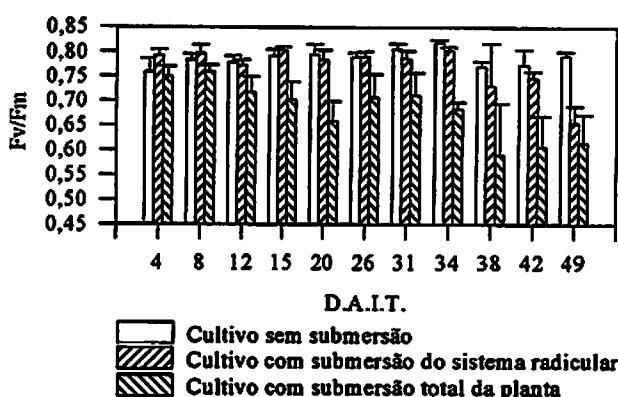


FIGURA 6. Eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

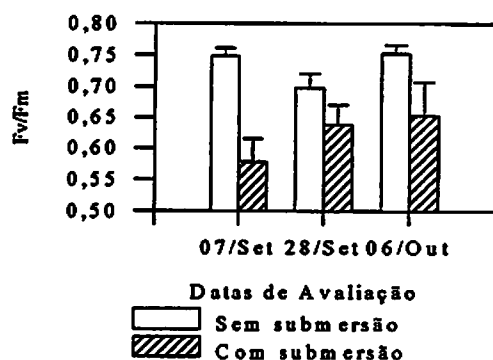


FIGURA 7. Eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

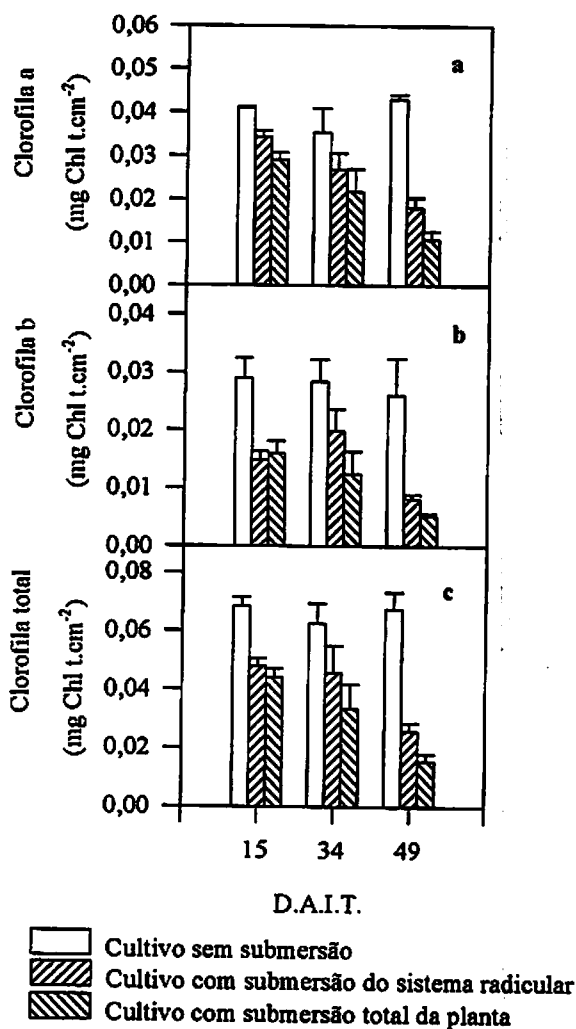


FIGURA 8. Variação no teor de clorofilas a (a), b (b) e total (c), de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

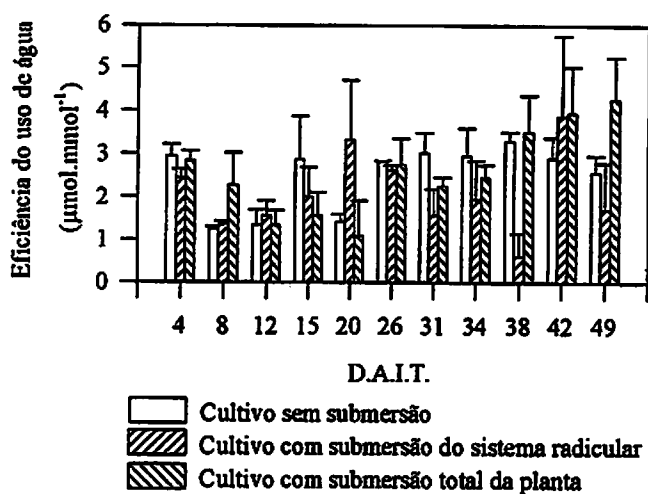


FIGURA 9. Eficiência do uso da água (EUA), em plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

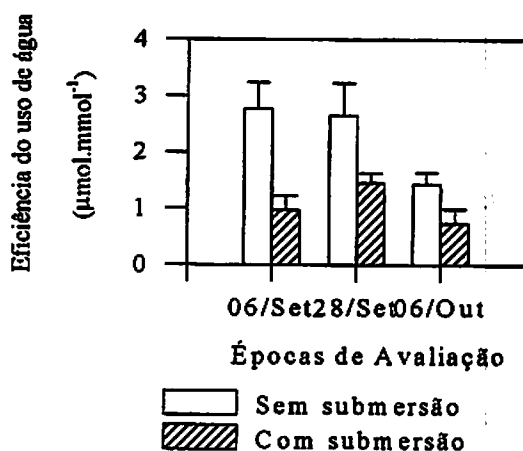


FIGURA 10. Eficiência do uso da água (EUA), em plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

Deve-se chamar a atenção para alguns fatos sobre esta parte do trabalho. As plantas em submersão total eram retiradas desta condição para se quantificar a fotossíntese líquida com o IRGA, pois era impossível avaliá-las sob o nível da água. Por tanto, os dados obtidos com a utilização deste aparelho só permitem inferir sobre danos a que as condições adversas impostas por este tratamento causaram no "aparelho" fotossintético. Outro fato que deve ser destacado foi a tentativa de retirada do "lodo" presente nas folhas das plantas nos tratamentos em que a planta estava totalmente submersa. Este procedimento deve ter afetado os valores de fotossíntese líquida.

4.3. Teores de açúcares solúveis totais (AST), redutores (AR) e amido.

Nas folhas, a exceção dos AR, os demais teores de carboidratos apresentaram-se maiores que nas raízes (Figura 11). Observa-se também que o alagamento das plantas não induziu a uma redistribuição diferenciada dos carboidratos entre parte aérea e raiz, ou seja, não causou um deslocamento de carboidratos de forma diferenciada do controle.

Botelho (1996), trabalhando com esta espécie, encontrou comportamento diferente de açúcares solúveis totais, sugerindo Ter havido redistribuição diferenciada dos açúcares nesta planta. Entretanto, a exemplo destes trabalhos, a literatura registra que, sob condições de submersão, as plantas podem ou não apresentar a característica de redistribuição diferenciada de carboidratos (Perata, Guglielminetti e Alpi, 1997; Drew, 1997; Drew et al., 1994; Haddad, 1998 e Guglielminetti, Perata e Alpi, 1994)

Os menores teores de AST (Figuras 11a, b), AR (Figura 11c, d) e amido (Figura 11e, f) foram verificados nas folhas e raízes de plantas totalmente submersas, não observando-se, de maneira geral, diferenças significativas entre os tratamentos controle e as raízes submersas. Comparativamente às plantas com raízes submersas, a maior fotossíntese potencial das plantas totalmente alagadas (Figura 4) não levou a um maior teor de carboidratos. Por outro lado, estas últimas plantas apresentaram um menor desenvolvimento vegetativo (Figura 1), sugerindo que os produtos fotossintéticos sintetizados por estas plantas não foram de ordem estrutural.

O comportamento dos AST (Figura 12a) e AR (Figura 12b) nas folhas das plantas adultas no reservatório de Camargos mostra que, nas duas primeiras avaliações, as plantas do tratamento controle apresentaram maiores teores destes açúcares, vindo a se igualar com o tratamento com submersão na última

avaliação. Estes resultados mostram uma estreita relação entre o acúmulo destes carboidratos e a fotossíntese (Figura 4a).

Outro aspecto é que tanto nas folhas dos dois experimentos quanto nas raízes do experimento de casa de vegetação observa-se que a diferença entre AST e AR é bem maior que o valor de AR, indicando que a maior parte dos AST são sacarose já que quase a totalidade do açúcar não redutor encontrado nos AST é sacarose. E observa-se que em ambos os experimentos, independentemente do tratamento, plantas de ingá produzem um elevado teor desses açúcares não redutores. Para Perata, Guglielminetti e Alpi (1997), quantitativamente, dentre os açúcares não redutores, a sacarose representa o maior constituinte dos AST.

Esta maior presença de sacarose pode estar relacionada com a produção de energia pela via da sacarose sintase, como meio alternativo de suprimento da glicólise (Guglielminetti, Perata e Alpi, 1994 e Perata, Guglielminetti e Alpi, 1997).

Pode-se notar ainda, observando as Figuras 11e e 11f, que o teor de amido é menor nas plantas submetidas a submersão total, indicando que a planta não está armazenando amido para a utilização em um período pós-estresse. Estes resultados demonstram que a manutenção de um certo nível de carboidratos (AST e AR) pelas plantas durante o período de alagamento pode representar um importante mecanismo de adaptação desta espécie à condição de déficit de oxigênio, por garantir um "pool" de carbono e de energia para suprir a retomada de crescimento no período pós-estresse.

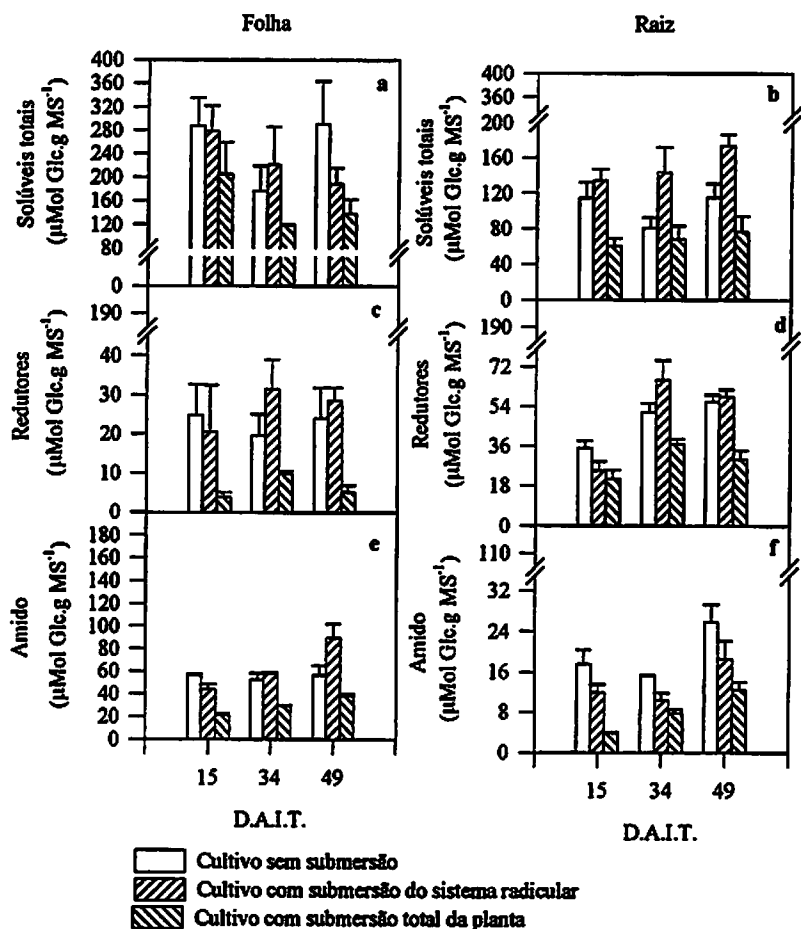


FIGURA 11. Comportamento dos teores de açúcares solúveis totais (a, b), redutores (c, d) e amido (e, f) em folhas (a, c, e) e raízes (b, d, f), de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

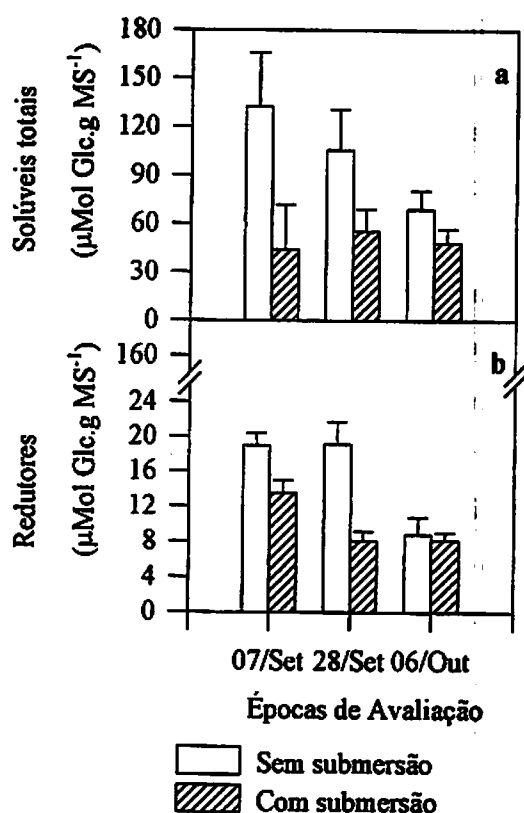


FIGURA 12. Comportamento dos teores de açúcares solúveis totais (a) e redutores (b) de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

4.4. Teor de proteínas

Relativamente ao teor de proteínas, verifica-se um aumento nas folhas das plantas parcialmente alagadas, enquanto que nas plantas com submersão total, o teor caiu (Figura 13), à semelhança do que aconteceu nas raízes, para os dois tratamentos de submersão. O aumento no teor de proteínas durante o período de alagamento nas raízes, está associado possivelmente a síntese de proteínas aeróbicas em função da exposição deste órgão ao oxigênio. O aumento do conteúdo de proteína pode estar relacionado à maquinaria para síntese de polipeptídeos nas folhas durante as condições desfavoráveis, como forma de garantir um mínimo de energia necessária para a manutenção de vias metabólicas alternativas para a produção de ATP (Moraes, 1995; Sachs et al., 1980; Mocquot et al., 1991). Da mesma maneira, o decréscimo nos teores de proteínas possa estar ligado à degradação das mesmas.

No experimento de Camargos o teor de proteínas não apresentou diferença entre os tratamentos, indicando que estes não afetaram o teor de proteínas (Figura 14).

Esses resultados obtidos nas raízes estão de acordo com vários outros resultados encontrados na literatura (Perata, Guglielminetti e Alpi, 1997; Andrews et al., 1994a; Mottanty, Wilson e Rees, 1993 e Moraes, 1995). Neumam e VanToai (1991) e Turner (1990) explicam que pode-se atribuir a redução do teor protéico à degradação das proteínas pela síntese e/ou ativação de proteases, que normalmente acontece em BDO.

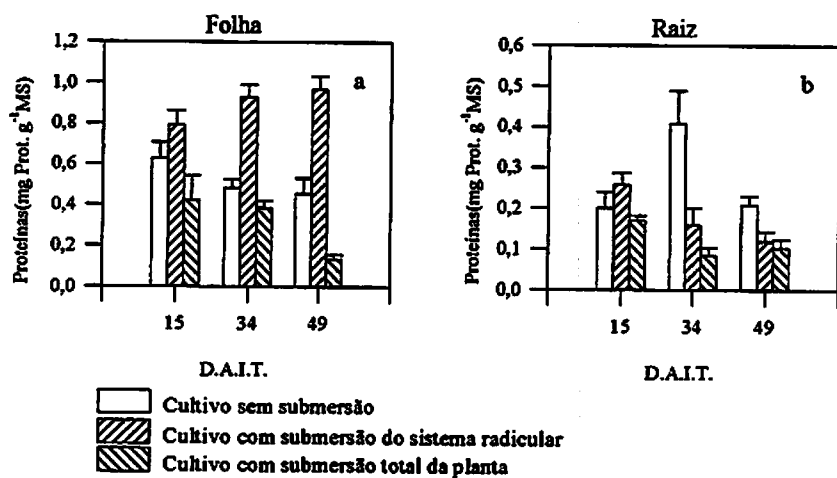


FIGURA 13. Comportamento dos teores de proteínas nas folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

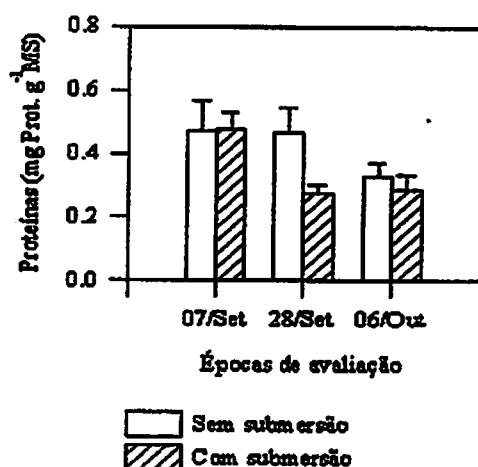


FIGURA 14. Comportamento dos teores de proteínas de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

4.5. Atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase

De maneira geral, verifica-se que o alagamento das plantas provocou um aumento na atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e lactato desidrogenase (LDH) em folhas e raízes, sendo mais acentuado nas plantas totalmente submersas (Figuras 15 e 16). Observa-se, também, que o aumento na atividade da ADH foi mais expressivo nos órgãos que estavam completamente submersos, como, por exemplo, folhas e raízes de plantas totalmente submersas e raízes de plantas parcialmente submersas. Em relação a LDH, este aumento na

atividade foi independente da posição do órgão em relação à submersão. Nas plantas adultas cultivadas às margens do reservatório de Camargos, observa-se que ambas as enzimas apresentaram uma maior atividade sob condições de alagamento (Figuras 17 e 18).

A literatura tem mostrado, intensivamente, que sob condições de deficiência de oxigênio, ocorre um aumento do metabolismo anaeróbico em determinado grupo de plantas (Schaffer, 1998; e Rivoal et al., 1997; Drew, 1997; Vartapetian e Jackson, 1997; Perata et al., 1997; Rivoal et al., 1997). Uma maior atividade das enzimas ADH e LDH tem sido associada à preservação da carga energética do adenilato, fundamental para a manutenção de uma atividade metabólica celular mínima que permita a sobrevivência das plantas nestas condições. Verifica-se claramente neste trabalho que não houve uma limitação de carboidratos, mas sim uma insuficiência do metabolismo anaeróbico e, indiretamente, a energia produzida não foi suficientemente elevada para garantir um crescimento em níveis semelhantes ao das plantas controle (Figura 2), sendo entretanto, suficiente para mantê-las vivas. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os encontrados por Menezes Neto (1994) que trabalhando com *Eutrepe oleracea* verificou maiores atividades destas enzimas nos tecidos que estavam em condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

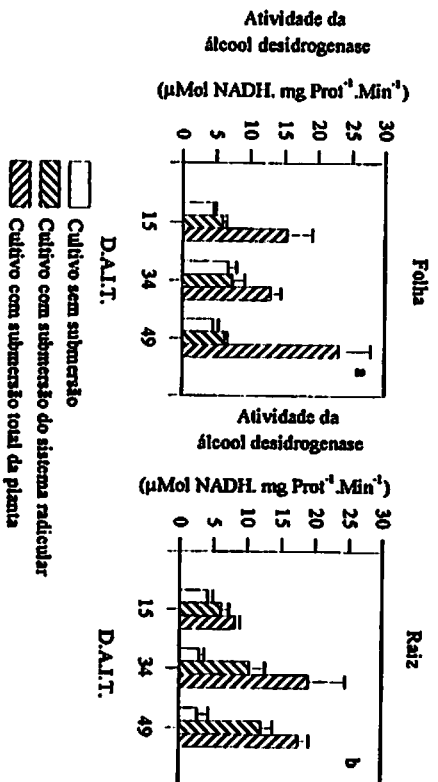


FIGURA 15. Atividade da álcool desidrogenase em folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

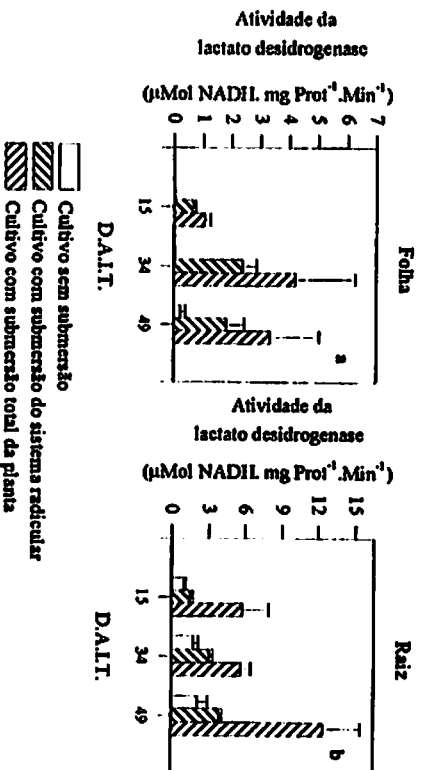


FIGURA 16. Atividade da lactato desidrogenase em folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

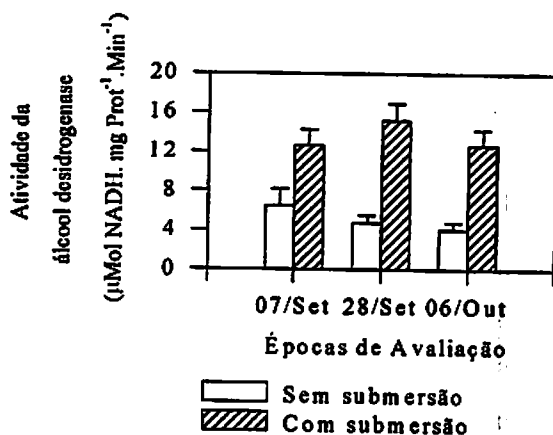


FIGURA 17. Atividade da álcool desidrogenase de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições o erro padrão da média.

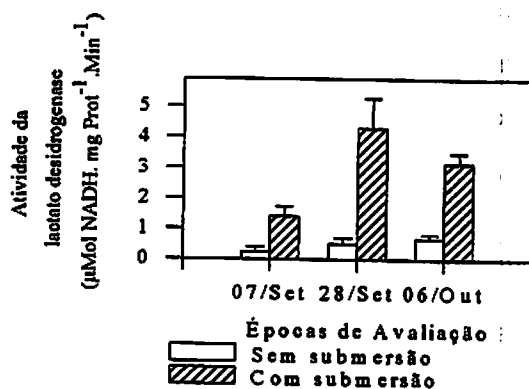


FIGURA 18. Atividade da lactato desidrogenase de plantas cultivadas em área de depleção às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

4.6. Atividade da redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT)

Nas folhas das mudas de ingá em vasos, foi observada uma pequena atividade da RN, sem diferenças significativas entre os tratamentos com submersão e o não submerso em todos os periodos de avaliação (Figura 19a). Entretanto, na ultima avaliação, aos 49 dias, houve um aumento expressivo da atividade nas folhas de plantas sob alagamento total, diferindo estatisticamente da atividade verificada das plantas parcialmente alagadas mas igual ao das plantas sem submersão. Este expressivo aumento na atividade específica desta enzima, que também ocorreu nas raízes de plantas sob alagamento (Figura 19b), pode ser devido, especificamente, a um decréscimo significativo no teor de proteínas, que foi a base de expressão dos resultados das atividades. Entretanto, apesar desse aspecto, os resultados da atividade da RN em raízes das plantas parcialmente submersas neste trabalho acompanham os encontrados por Pelacani (1992) que, trabalhando com a mesma espécie, verificou um aumento da atividade desta enzima nos tecidos de raiz. Porém o mesmo não foi verificado por Botelho (1996) que também trabalhou com esta espécie nestas condições. Ressalta-se, também, que a literatura aponta a RN como um polipeptídeo anaeróbico (Kemp e Small, 1993; Glaab e Kaiser, 1993, Mattana et al., 1994, Newman e VanToai, 1991). Não foram observadas diferenças significativas entre as atividades da RN em folhas de plantas adultas alagadas e não alagadas em condições de campo (Figura 20).

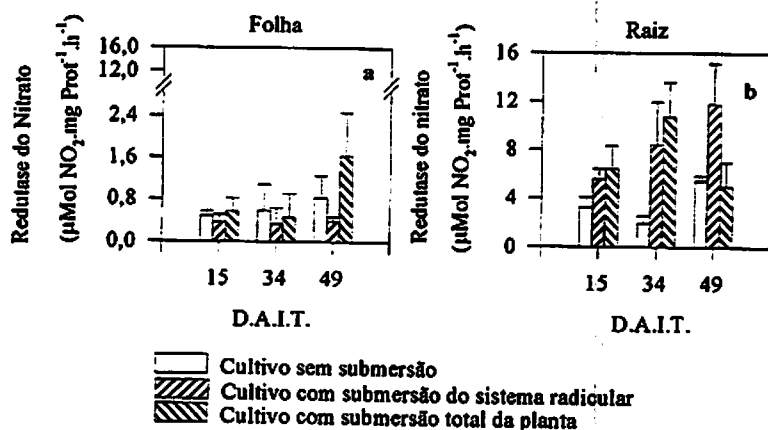


FIGURA 19. Atividade da redutase do nitrato em folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

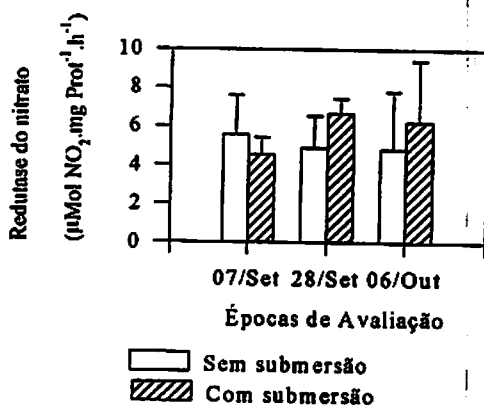


FIGURA 20. Atividade da redutase do nitrato em folhas de plantas cultivadas às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

Estes resultados indicam ainda que, nas condições de baixa disponibilidade de oxigênio, pode haver uma competição pelo poder redutor entre os processos de redução do nitrato e metabolismo anaeróbico, sugerindo que o nitrato atue como aceptor de elétrons (Drew, 1997). Entretanto, para Mattana et al. (1994); Saglio, Drew e Pradet (1988) e Kemp e Small (1993), este processo em que o nitrato funciona como aceptor alternativo de elétrons não é competitivo por NADH com a enzima ADH e LDH, contribuindo, desta forma, para aumentar a velocidade e a continuação da glicólise.

Na média, a menor atividade da GS nas mudas em vaso foi encontrada nas folhas de plantas totalmente alagadas (Figura 21a). Este padrão de atividade mostra claramente que, neste órgão, uma maior atividade da RN não foi seguida por uma maior atividade da GS. Ao contrario das folhas, a atividade da GS na raiz seguiu basicamente a atividade da RN (Figura 21b). Em condições de campo, a atividade da GS não variou entre os tratamentos e períodos de amostragem (Figura 22), seguindo basicamente o mesmo padrão de comportamento da RN. Em relação a fd-GOGAT, nas plantas cultivadas em vaso observa-se uma alta atividade da enzima nas folhas de plantas totalmente alagadas e nas raízes das plantas parcial e totalmente alagadas (Figura 23). Por outro lado, na área de depleção às margens do reservatório de Camargos, a atividade desta enzima não variou entre os tratamentos e em nenhum período de amostragem, seguindo basicamente o comportamento da atividade da RN e GS.

Os resultados sugerem que a regulação do metabolismo de nitrogênio em *ingá* variou em função da idade da planta e da forma com que ocorreu o estresse. Plantas jovens, cultivadas em vasos, apresentaram, de maneira geral uma maior atividade das enzimas estudadas. Como a adubação foi feita somente na forma nítrica, parece que a presença deste íon estimulou a síntese ou ativação da RN e o produto de sua atividade estimulou a ação das enzimas que atuam

subseqüentemente a ela. Diversos trabalhos na literatura relatam tal fato (Mattana et al., 1994 e Reggiani et al., 1993). Por outro lado, em Camargos, nos períodos que antecederam o experimento, não foi aplicado nenhum tipo de adubo mineral. A semelhança de atividade de todas as enzimas estudadas entre os tratamentos alagados ou não sugere que no solo estava presente, além do nitrato, o íon amônio. Esta hipótese se baseia no fato de que em solos sob condições de excesso de água, predomina a forma amoniacal, pela redução do nitrito a amônio (Reggiani et al., 1993; Mattana et al., 1994 e Kaiser, Layzell e Shelp, 1997).

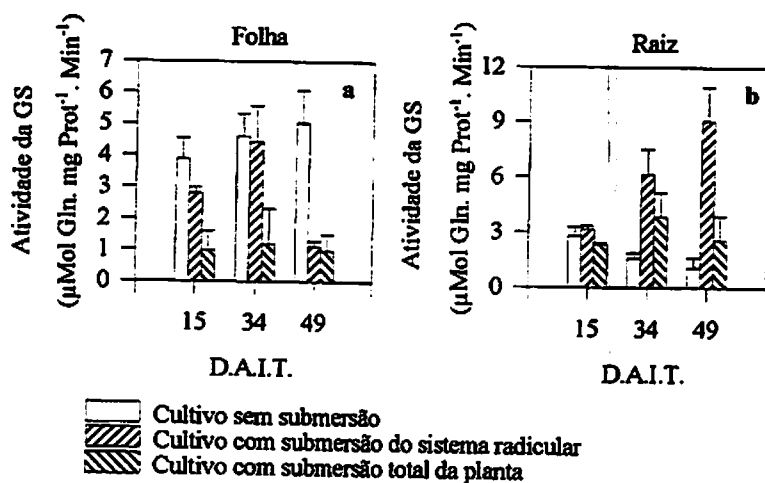


FIGURA 21. Atividade da glutamina sintetase em folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

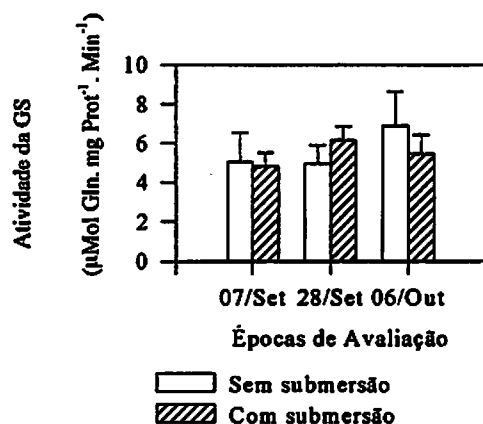


FIGURA 22. Atividade da glutamina sintetase de plantas cultivadas às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

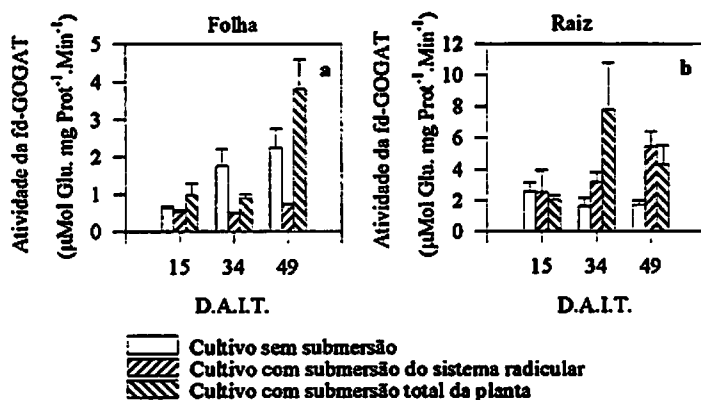


FIGURA 23. Atividade da glutamato sintase em folhas (a) e raízes (b) de plantas cultivadas em vasos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de quatro repetições e o erro padrão da média.

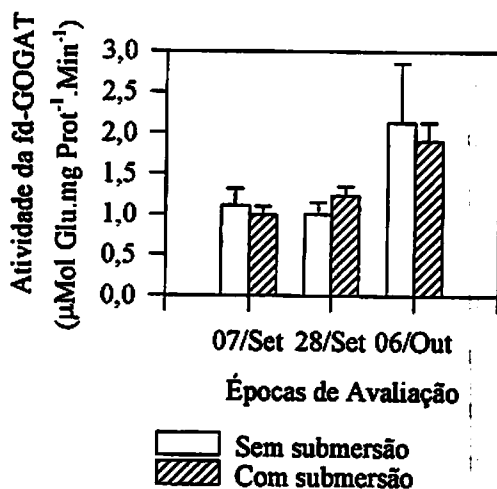


FIGURA 24. Atividade da glutamato sintase de plantas cultivadas às margens do reservatório de Camargos, submetidas a diferentes tempos e alturas de submersão. Os símbolos e barras indicam o valor médio de cinco repetições e o erro padrão da média.

5. CONCLUSÕES

As plantas de ingá, tanto em condições de campo quanto em condições de vaso, suportaram a submersão parcial e total. Na submersão ao nível das raízes, as plantas cresceram a taxas semelhantes àsquelas verificadas pelas plantas controle. Por outro lado, a submersão total das plantas afetou o seu desenvolvimento paralisando o seu crescimento sem, entretanto, levá-las à morte.

De maneira geral, o metabolismo do carbono foi afetado negativamente pela submersão das plantas. A fotossíntese líquida foi menor nos tratamentos com submersão e a fotossíntese potencial apresentou-se mais afetada nos tratamentos com submersão do sistema radicular.

A fotossíntese líquida foi, em todos os tratamentos, mais influenciada pela eficiência de carboxilação que pelas demais correlações estudadas.

A eficiência do fotossistema II (F_v/F_m) foi menor nos tratamentos com alagamento das plantas, sendo, entretanto, que no tratamento com submersão total os valores de F_v/F_m decresceram mais rapidamente com o tempo de submersão do que no tratamento com alagamento do sistema radicular.

Os teores de clorofilas a, b e total foram reduzidos pela submersão, sendo que as respostas mais pronunciadas ocorreram no tratamento com submersão total das plantas.

De maneira geral, somente a submersão total das plantas reduziu os teores de carboidratos tanto nas folhas quanto nas raízes.

As plantas que sofreram submersão parcial e total apresentaram maiores atividades das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e lactato desidrogenase

(LDH) nas folhas e nas raízes, sendo, entretanto, mais pronunciados na ADH das raízes das plantas completamente submersas.

A atividade da redutase do nitrato, *in vivo*, nos tecidos foliares não foi afetada pela submersão das plantas, tanto em condições de vasos como de campo. Entretanto, nas raízes esta enzima apresentou atividade maior nas plantas com submersão somente das raízes.

A atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase dependente de ferredoxina (fd-GOGAT) não foi afetada pela submersão parcial ou total da planta.

6. BIBLIOGRAFIA

- AKILAN, K.; FARRELL, R.C.C.; BELL, D.T.; MARSHALL, J.K. Responses of clonal river red gum (*Eucalyptus camaldulensis*) to waterlogging by fresh and salt water. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.37, p243 – 248, 1997.
- ALLEN, J.A.; PEZESHKI, S.R.; CHANBERS, J.L. Interaction of flooding and salinity stress on balcypress (*Taxodium distichum*). *Tree Physiology*, v.16, p307 – 313, 1996.
- ANDREWS, D.L.; DREW, M.C.; JOHNSON, J.R.; COBB, B.G. The responses of maize seedling of diferent ages to hipoxic and anoxic stress. *Plant Phisiology*, v.105, p.53-60, 1994a.
- ANDREWS, D.L.; MacALPINE, D.M.; JOHNSON, J.R.; KELLEY, P.M.; COBB, B.G.; DREW, M.C. Differential induction of mRNAs for the glycolytic and etanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. *Plant Phisiology*, v.106, p.1575-1582, 1994b.
- ATWELL, B.J.; DREW, M.C.; JACSON, M.B. The influence of oxygen deficiency on ethylene synthesis, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels and aerenchyma formation in roots of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, v.12, p.15-22, 1988.
- BOTELHO, M.N. Características morfo-anatomicas, fisiológicas e atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de ingá (*Inga vera willd*), virola (*Virola surinaminensis* (Rol.) Warb) e seringueira (*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg) submetidas a diferentes níveis e tempos de inudação. Lavras: UFLA. 49 p. 1996 (Tese de mestrado).
- BURDICK, D.M.; MENDELSSOHN, I.A. Relationship between anatomical and metabolic responses to soil waterlogging in the coastal grass *Spartina patens*. *Journal of Experimental Botany*. v.41. p 223-228. 1990.

- COBB, B.G.; KENNEDY, R.A. Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oriza sativa*) and *Echinochloa* seedlings. *Plant Cell Environment*, v.10, p.633- 638, 1987.
- CRAWFORD, R.M.M.; BRAENDLE, R. Oxygen deprivation stress in chaging environment. *Journal of Experimental Botany*, v.47, p.145-149, 1996.
- DAUGHERTY, C.J.; MUSGRAVE, M.E. Characterization of population of rapid-cycling *Brassica rapa* L. selected for differential waterlogging tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 45, p 385 – 392, 1994.
- DELIEU, T.; WALKER, D.A. The use of the oxygen electrode and fluorescence probsinsimple measurements of photosynthesis. *New Phytologist*, v.89, p.165-178, 1981.
- DREW, M.C.; COBB, B.G.; JOHNSON, J.R.; ANDREWS, D. MORGAN, P.W.; JORDAN, W.; HE, C.J. Metabolic acclimation of root tips to oxygen deficiency. *Annals of Botany*, v.74, p.281-286, 1994.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury an acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology*, v.48, p.223-250, 1997.
- ELSE, M.A.; DAVIES, W.J.; MALONE, M.; JACKSON, M.B. Negative hydraulic message from oxygen-deficient roots of tomato plants? *Plant Physiology*, v.109, p.1017-1024, 1995b.
- ELSE, M.A.; HALL, K.C.; ARNOLD, G.M.; DAVIES, W.J.; JACKSON, M.B. Export of abscisic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, phosphate, and nitrate fron roots to shoots of flooded tomato plants. *Plant Physiology*, v.107, p.377-384, 1995a.
- FOX, T.C.; KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptation of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. *Annals of Botany*, v.74, p.445-455, 1994.
- GLAAB, J.; KAISER, B.N. Rapid modulation of nitrate reductase in pea root. *Planta*, v.191, p.173-179, 1993.

- GRAVATT, D.A.; KIRBY, C.J. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. v.18, p.411-417, 1998.
- GUGLIELMINETTI, L.; PERATA, P.; ALPI, A. Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiology*, v.108, p.735-741, 1995.
- HADDADE, I.R. Crescimento de espécies forrageiras tropicais submetidas a diferentes períodos de alagamento. Viçosa: UFV. 80p. 1998 (Tese de mestrado).
- HOLDEN, M. Chlorophylls. in: GOODWING, T.W. ed. Chemistry and biochemistry of plant pigments II. New York, Academic Press, p.7, 1976.
- HUANG, B.; JOHNSON, J.W.; NESMITH, S.; BRIDGES, D.C. Growth, physiological and anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging and nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, v. 45, p.193-202, 1994.
- KAISER, B.N.; LAYZELL, D.B.; SHELP, B.J. Role of oxygen limitation and nitrate metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation by pea. *Physiologia Plantarum*, v.101, p.45-50, 1997.
- KEMP, K.; SMALL, J.C.G. Nitrate and nitrate reductase in *Erithrina caffra* seeds: Enhancement of induction by anoxia and possible role in germination. *Planta*, v.189, p.298-300, 1993.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants *Plant Physiology*, v. 100, p.1-6, 1992.
- KOZLOWSKI, T.T. Responses of wood plants to flooding and salinity. <http://www.heronpublishing.com/tp/monograph/kozlowiski.pdf>. 1998
- KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. Effect of flooding on water, carbohydrate, and mineral relation. In: *Flooding and Plant Growth*. Kozlowski, T.T., p.165 - 188. 1984.
- KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. Water relation of plants soils. Academic Press. San Diego - California. 1995. 495p.

- LAAN, P.; BLOM, W.P.M. Growth and survival responses of *Rumex* species to flooded and submerged conditions: The importance of shoot elongation, underwater photosynthesis and reserve carbohydrates. *Journal of Experimental Botany*. v. 41. p 775 - 783. 1990.
- LINDROTH, A.; CIENCIALA, E. Water use efficiency of short-rotation *Salix viminalis* at leaf, tree and stand scales. *Tree Physiology*, v16, p.257-262, 1996
- MATTANA, M.; CORAGGIO, I., BERTANI, A. e REGGIANI, R. Expression of the enzymes of nitrate reduction during the anaerobic germination of rice. *Plant Physiology*. v. 106: p. 1605-1608. 1994.
- MENEZES NETO, M.A. Influência da disponibilidade de oxigênio sobre a germinação, crescimento e atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Lavras: UFLA, 1994. 50p. (Tese de mestrado).
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MOCQUOT, B.; PRATT, C.; MOUCHES, C.; PRADET, A. Effects of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryo. *Plant Physiology*, v.68, p.636-640, 1981.
- MOHANTY, B.; WILSON, P.M.; REES, T. Effects of anoxia on growth and carbohydrate metabolism in suspension cultures of soybean and rice. *Phytochemistry*, v.34, p.75-82, 1993.
- MOORE, B.d.; PALMQUIST, D.E.; SEEMANN, J.R. Influence of plant growth at high CO₂ concentration on leaf content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco, snapdragon, and parsley. *Plant Physiology*, v.115, p.241-248, 1997.
- MORAES, M.G. de. Efeitos da anoxia no teor de proteínas e nas atividades da álcool e lactato desidrogenase em espécies herbáceas. Lavras: UFLA, 42p.1995 (Tese de mestrado).

- NEWMAN, K.D.; VanTOAL, T.T. Developmental regulation and organ-specific expression of soybean alcohol dehydrogenase. *Crop Science*, v.31, p.1253-1257, 1991.
- OLIVEIRA, J.G.de. Acompanhamento da fotossíntese líquida e da cinética de emissão de fluorescência da clorofila *a* de plantas de café (*Coffea arabica* L.) submetidas a um ciclo de suspensão e restabelecimento da irrigação. Viçosa: UFV, 1995. 55p. (Tese de mestrado).
- PELACANI, C.R. Estratégias de sobrevivência de plantas herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas a inundação do sistema radicular. Lavras: ESAL. (Tese de mestrado). 110p. 1992.
- PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L.; ALPI, A. Metabolization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, v.79, p.49-56, 1997.
- PEZESHKI, S.R. Responses of baldcypress (*Taxodium distichum*) seedlings to hipoxia: leaf protein content, ribulose-1,5-biphophate carboxilase/oxigenase activity and photosynthesis. *Photosynthetica*, v. 30, p.59-68, 1994.
- 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 condition. *Tree Physiology*, v. 16, p.453-458, 1996.
- PONNAMPERUMA, F.N. Effects of flooding on soil. In: *Flooding and Plant Growth*. Kozlowski, T.T. Academic Press, London, 1972. p.10 - 42.
- QUICK, P; SIEGL, G.; NEUHAUS, E.; FEIL, R.; STITT, M. Short-term water stress leads to stimulation of sucrose synthesis by activation sucrose-phosphate synthase. *Planta*, v.177, p.535-546, 1989.
- REGGIANI, R.; BRANBILLA, I.; BERTANI, A. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots. *Journal of Experimental Botany*, Vol.36, p.1698-1704, 1985.
- REGGIANI, R.; MATTANA, M.; AURISANO, N.; BERTANI, A. The rice coleoptile: an example of anaerobic nitrate assimilation. *Physiologia Plantarum*, v. 89, p.640-643, 1993.

- RIVOAL, J.; THIND, S.; PRADET, A.; RICARD, B. Differential induction of piruvate decarboxylate subunits and trancripts in anoxic rice seedlings. *Plant Physiology*, v.114, p.1021-1029. 1997.
- SAGLIO, P.H.; DREW, M.C.; PRADET, A. Metabolic acclimation to anoxia induced by low (2-4kPa partial pressure) oxygen pretreatment (hypoxia) in roots tips of *Zea mays*. *Plant Physiology*, v. 86, p.0061-0066, 1988.
- SCHAFFER, B. Flooding responses and water-use efficiency of subtropical and tropical fruit tree in an environmentally-sensitive wetland. *Annals of Botany*, v.81, p.475-481, 1998.
- SCHREIBER, U.; GADEMANN, R.; RALPH, P.J.; LARKUN, A.W.D. Assessment of photosynthetic performance of *Prochloron* in *Lisoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Physiology*, v.38(8), p.945-951, 1997.
- SCOTT, H.D.; DeANGULO, J.; DANIELS, M.B.; WOOD, L.S. Flood duration effects on soybean growth and yield. Published in *Agron.J.*, v.81, p.631-636, 1989.
- SENA GOMES, A.R.; KOZLOWSKI, T.T. Physiological and growth responses to flooding of seedlings of *Hevea brasiliensis*. *Biotropica*, v.20, p.286-293, 1988.
- SUN, O.J.; SWEET, G.B.; WHITEHEAD, D.; BUCHAN, G.D. Physiological responses to water stress and waterlogging in *Nothofagus* species. *Tree Physiology*, v. 15, p.629-638, 1995.
- THOMPSON, W.A.; HUANG, L.-K.; KRIEDEMANN, P.E. Photosynthetic response to light and nutrients in sun-tolerant rainforest trees. II.*leaf gas exchange and component process of photosynthesis. *Australian Journal Plant Physiology*, v.19, p.19-42, 1992.
- TURNER, L.B. The extent and pattern of osmotic adjustment in white clover (*Trifolium repens* L.) during the development of water stress. *Annals of Botany*, v.66, p.721-727, 1990.
- UCHIMO, A.; SAMEJIMA, M.; ISHII, R.; UENO, O. Photosynthetic carbon metabolism in an amphibious sedge, *Eleocharis baldwinii* (Torr.)Chapman:

Modified expression of C₄ characteristics under submerged aquatic conditions. *Plant Cell Physiology*, v.36(2), p.229-238, 1995.

VanTOAI, T.; FAUSEY, N.; McDONALD, M.Jr. Oxygen requirements for germination and growth of flood-susceptible and flood-tolerant corn lines. *Crop Science*, v.28, p.79-83, 1988.

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

VU, J.C.V.; YELENOSKI, G. Photosynthetic responses of citrus tree to soil flooding. *Phisyologia Plantarum*, v.81, p.7-14, 1991.

YEMM, E.W.; WILLS, A.J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by antrone. *The Biochemical Journal*, London, p.508-514, 1954.

YOUSSEF, T.; SAENGER, P. Photosynthetic gas exchange and accumulation phytotoxins in mangrove seedlings in response to soil physico-chemical characteristics associated with waterlogging. *Tree Physiology*, v.18, p.317-324, 1998.