

**CRESCIMENTO, ANATOMIA,
METABOLISMO ANAERÓBICO E SISTEMA
DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE PLANTAS
EM CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO**

ILISANDRA ZANANDREA

2009

ILISANDRA ZANANDREA

**CRESCIMENTO, ANATOMIA, METABOLISMO
ANAERÓBICO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE
PLANTAS EM CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO**

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

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Zanandrea, Ilisandra.

Crescimento, anatomia, metabolismo anaeróbico e sistema de
defesa antioxidante de plantas em condições de alagamento /
Ilisandra Zanandrea. – Lavras : UFLA, 2009.

73 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Sesbania virgata*. 2. *Polygonum acuminatum*. 3. *Melinis
minutiflora*. 4. Metabolismo anaeróbico. 5. Estresse oxidativo I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 571.2

ILISANDRA ZANANDREA

**CRESCIMENTO, ANATOMIA, METABOLISMO
ANAERÓBICO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE
PLANTAS EM CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Dr. Dárlan Einstein do Livramento	Epamig
Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	Unilavras
Prof. Dr. Sidnei Deuner	UFPeL
Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA

Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida.

Aos meus pais, Laurindo e Libra, por tudo o que já fizeram por mim, por todas as lições que não podem ser encontradas em livros.

Ao meu marido, Juliano, que sempre me estimula a crescer científica, ética, profissional e pessoalmente e sempre ficou ao meu lado, me apoiando durante esses três anos.

Aos meus familiares, por perdoarem minha ausência durante a realização deste trabalho, em especial ao meu irmão Idissoni, por todo apoio, ajuda e amizade.

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

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

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

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

Aos membros da banca examinadora, Patrícia de Fátima Pereira Goulart, Dárlan Einstein do Livramento, Evaristo Mauro de Castro, Sidnei Deuner e Marcelo Murad Magalhães.

Ao Sidnei, pela ajuda nas análises bioquímicas e pelas ótimas sugestões profissionais e práticas na redação deste trabalho.

A Cynthia, por toda ajuda na parte de anatomia e pela paciência comigo, além da amizade.

Aos funcionários Evaristo e Dartanhan, pelo auxílio e amizade.

A Lena, Joel, Odorêncio e Celem, pela simpatia, amizade e ajuda sempre prestados.

Aos colegas e amigos do Laboratório: Paola, Neidiquele, Meline, André, Solange, Kamila e Rafael, pela amizade e ajuda na realização do trabalho.

Aos amigos gaúchos, Daiane e Rafa, Brenda, Rafael, Camila, Ariadne, Vanessa, pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis.

A Carla, Éder e Bernardo, nossa “família” aqui em Lavras, por todos os momentos bons que passamos juntos, pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade.

A Bela, por toda alegria que transmite.

BIOGRAFIA

Ilisandra Zanandrea, filha de Laurindo Zanandrea e Libra Gregolin Zanandrea, nasceu em São João da Urtiga, no dia 29 de julho de 1978. Coursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Frei José, de São João da Urtiga, concluindo-o em 1995. Em abril de 1999, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas. Em novembro de 2003, graduou-se e iniciou, em 2004, o mestrado em Fisiologia Vegetal, na mesma Universidade. Em 2006, iniciou o doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, MG, encerrando esta etapa profissional com a defesa da presente tese.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material vegetal.....	11
3.2 Obtenção das plantas.....	11
3.3 Condições ambientais do experimento.....	12
3.4 Crescimento vegetativo.....	13
3.5 Carboidratos.....	13
3.6 Atividades enzimáticas.....	14
3.6.1 Enzimas do metabolismo anaeróbico.....	14
3.6.1.1 Desidrogenase alcoólica e Desidrogenase láctica.....	14
3.6.1.2 Descarboxilase do piruvato.....	14
3.6.2 Enzimas do metabolismo antioxidante.....	15
3.6.2.1 Dismutase do superóxido.....	15
3.6.2.2 Catalase.....	16
3.6.2.3 Peroxidase do ascorbato.....	16
3.6.2.4 Redutase do dehidroascorbato.....	16
3.6.2.5 Redutase da glutathione.....	16
3.7 Avaliações bioquímicas.....	17
3.7.1 Peroxidação lipídica.....	17
3.7.2 Peróxido de hidrogênio.....	17
3.7.3 Ascorbato e dehidroascorbato.....	18
3.8 Gel de atividade.....	18
3.9 Avaliações anatômicas.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Efeito do alagamento sobre o crescimento e sobrevivência das plantas.....	20
4.2 Carboidratos.....	29
4.3 Enzimas diretamente envolvidas no metabolismo anaeróbico.....	37
4.4 Adaptações morfo-anatômicas.....	43
4.5 Enzimas antioxidantes.....	47
4.6 Avaliações bioquímicas diretamente envolvidas com o estresse oxidativo.....	58
5 CONCLUSÕES.....	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIACÕES

ADH	Desidrogenase alcoólica
APX	Peroxidase do ascorbato
AR	Açúcar redutor
AST	Açúcar solúvel total
CAT	Catalase
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Redutase do dehidroascorbato
GR	Redutase da glutatona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LDH	Desidrogenase ltica
MDA	Malondialdeído
MDHAR	Redutase do monodehidroascorbato
PDC	Descarboxilase do piruvato
SOD	Dismutase do superóxido

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Número de folhas e altura de plantas submetidas ao alagamento.....	23
FIGURA 2 Massa seca da parte aérea e das raízes de plantas submetidas ao alagamento.....	28
FIGURA 3 Sobrevivência de plantas após alagamento.....	29
FIGURA 4 Teor de amido em plantas submetidas ao alagamento.....	32
FIGURA 5 Teor de açúcares solúveis totais em plantas submetidas ao alagamento.....	35
FIGURA 6 Teor de açúcares redutores em plantas submetidas ao alagamento.....	36
FIGURA 7 Atividade da Desidrogenase do lactato em raízes de plantas submetidas ao alagamento.....	40
FIGURA 8 Atividade da Descarboxilase do piruvato em raízes de plantas submetidas ao alagamento.....	41
FIGURA 9 Atividade da Desidrogenase alcoólica em raízes de plantas submetidas ao alagamento.....	42
FIGURA 10 Gel de atividade da Desidrogenase alcoólica em raízes de sesbania.....	43
FIGURA 11 Caule hipertrofiado de sesbania submetida ao alagamento do sistema radicular por 56 dias.....	44
FIGURA 12 Fotomicrografia da secção transversal da raiz principal de sesbania, erva-de-bicho e capim-gordura	46
FIGURA 13 Atividade da Dismutase do superóxido em plantas submetidas ao alagamento.....	49
FIGURA 14 Gel de atividade da Dismutase do superóxido em raízes de sesbania.....	50

FIGURA 15 Gel de atividade da Dismutase do superóxido em raízes de capim-gordura.....	50
FIGURA 16 Atividade da Catalase em raízes de plantas submetidas ao alagamento.....	51
FIGURA 17 Gel de atividade da Catalase em raízes de sesbania.....	52
FIGURA 18 Gel de atividade da Catalase em raízes de capim-gordura.....	52
FIGURA 19 Atividade da Peroxidase do ascorbato em raízes de plantas submetidas ao alagamento	53
FIGURA 20 Atividade da Redutase do dehidroascorbato em raízes de plantas submetidas ao alagamento	56
FIGURA 21 Atividade da Redutase da glutaciona em raízes de plantas submetidas ao alagamento	57
FIGURA 22 Peroxidação lipídica em raízes de plantas submetidas ao alagamento	60
FIGURA 23 Peróxido de hidrogênio em raízes plantas submetidas ao alagamento	61
FIGURA 24 Ascorbato e dehidroascorbato em raízes de plantas submetidas ao alagamento	63

RESUMO

ZANANDREA, Ilisandra. **Crescimento, anatomia, metabolismo anaeróbico e sistema de defesa antioxidante de plantas em condições de alagamento.** 2009. 73 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar o efeito do alagamento de plantas *Sesbania virgata*, *Polygonum acuminatum* e *Melinis minutiflora*, avaliando sua capacidade de adaptação às condições de alagamento. Para isso, plantas das três espécies, contendo seis folhas completamente expandidas, foram colocadas em tanques de alvenaria e submetidas às seguintes condições: controle (não alagado), alagamento das raízes e alagamento total das plantas. As avaliações foram realizadas no dia da indução do estresse e após 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias, para *sesbania*; 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias, para *erva-de-bicho* e 1, 2, 3, 4 e 5 dias para *capim-gordura*. Após 15 dias de retorno ao ambiente normóxico, foi avaliada a sobrevivência das plantas. Também foram avaliados: crescimento vegetativo (altura, número de folhas, massa seca da parte aérea e raízes), teor de carboidratos, atividade de enzimas envolvidas com o metabolismo anaeróbico (desidrogenase do lactato, descarboxilase do piruvato e desidrogenase alcoólica), atividade de enzimas do sistema antioxidante (dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato, redutase do dehidroascorbato e redutase da glutatona), além da quantificação de componentes bioquímicos diretamente envolvidos com o estresse oxidativo, como o peróxido de hidrogênio, ascorbato, dehidroascorbato e peroxidação lipídica. *Sesbania* e *erva-de-bicho* são tolerantes ao alagamento, suportando períodos de 56 e 21 dias, respectivamente. As causas desta tolerância são: fotossíntese ativa durante o período de estresse; acúmulo e utilização de carboidratos nas folhas e raízes e manutenção do crescimento vegetativo; ativação do metabolismo anaeróbico, principalmente nos passos catalisados pelas enzimas descaboxilase do piruvato e desidrogenase alcoólica e ativação do sistema antioxidante e formação de estruturas morfológicas, tais como aerênquimas e raízes adventícias. Por outro lado, o *capim-gordura* mostrou-se intolerante ao alagamento, apresentando sensibilidade ao estresse a partir das primeiras 24 horas, não suportando períodos superiores a cinco dias. Todas as características de tolerância mostradas pela *sesbania* e *erva-de-bicho* foram ausentes nesta espécie.

Palavras-chave: *Sesbania virgata*, *Polygonum acuminatum*, *Melinis minutiflora*, metabolismo anaeróbico, estresse oxidativo.

* Orientador: José Donizeti Alves - UFLA

ABSTRACT

ZANANDREA, Ilisandra. **Growth, anatomy, anaerobic metabolism and antioxidant defense system of plants in flooding conditions.** 2009. 73 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The aim of this work was to investigate the flooding effect in *Sesbania virgata*, *Polygonum acuminatum* e *Melinis minutiflora* plants, and their adaptation capacity to flooding. Plants with six leaves completely expanded were put inside the tanks and submitted to the following conditions: control (not flooded), root flooded and completely flooded. The evaluation was realized in the beginning of the stress induction, and after 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days to *S. virgata*, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 to *P. acuminatum*, and 1, 2, 3, 4 and 5 days to *M. minutiflora*. Fifteen days after return to normoxic conditions the plant survival, vegetative growth (length, number of leaves, plant and roots dry mass), carbohydrates, anaerobic metabolism enzyme activity (Lactate Dehydrogenase, Decarboxylase of pyruvate and Dehydrogenase Alcoholic), anti-oxidant enzyme activity (dismutase of superoxide, catalase, peroxidase of ascorbate, dehydroascorbate reductase and reductase of glutathione), and biochemistry components directly involved with oxidative stress (hydrogen peroxide, lipid peroxidation, ascorbate and dehydroascorbate) were evaluated. *S. Virgata* and *P.acuminatum* are tolerant to flooding, supporting periods of 56 and 21 days respectively. The causes of this tolerance are: Active photosynthesis during the stress period; accumulation and utilization of carbohydrates in leaves and roots and maintenance of vegetative growth, activation of anaerobic metabolism, mainly in steps catalyzed by the enzymes piruvate descarboxilase, alcohol desidrogenase; activation of antioxidant system and formation of morphological structures like aerenchymas and adventitious roots. The *M. minutiflora* showed intolerant to flooding, showing a high sensitivity to the stress since 24 hs, and did not support periods higher than five days. All the tolerance characteristics showed by *S. Virgata* and *P. Acuminatum* were absent in this specie.

Keywords: *Sesbania virgata*, *Polygonum acuminatum*, *Melinis minutiflora*, anaerobic metabolism, oxidative stress.

* Adviser: José Donizeti Alves - UFLA

1 INTRODUÇÃO

Muitas vezes, plantas em seu ambiente natural podem sofrer condições adversas, passando por períodos de estresse que podem ser breves ou duradouros. Muitas dessas plantas desenvolveram mecanismos que as fazem suportar as condições adversas, permitindo sua sobrevivência.

O alagamento do solo, que pode ser causado naturalmente, por períodos chuvosos intensos, má drenagem natural do solo e elevação sazonal do nível de rios e lagos ou artificialmente, pela ação de represas, é uma destas condições adversas. Isso porque as concentrações de oxigênio disponíveis para as raízes das plantas são rapidamente reduzidas, podendo afetar drasticamente o crescimento e o desenvolvimento de muitas espécies.

Em determinadas épocas do ano, o nível de água de rios e reservatórios pode diminuir, permitindo o surgimento de uma área de solo desnuda em suas margens, chamada área de depleção. Estas áreas ficam sujeitas à erosão, contribuindo para o assoreamento de reservatórios, diminuindo a capacidade de acumulação de água e, no caso de usinas hidrelétricas, um aumento no efeito abrasivo nas turbinas de geração, causado pelas partículas sólidas em suspensão.

A implantação de uma vegetação que suporte tais condições contribuiria para minimizar a erosão e os impactos ambientais causados pela criação dos reservatórios, como a submersão de matas nativas.

Um aspecto fundamental para a implantação de reflorestamentos ciliares em reservatórios ou, mesmo, em rios, lagos e açudes, é a escolha das espécies adequadas. Além de serem capazes de suportar condições de submersão total ou parcial, as plantas devem contribuir para a manutenção da biodiversidade, além de proporcionar benefícios sócio-econômicos para as populações ribeirinhas.

Neste contexto, plantas com propriedades medicinais e plantas com propriedades nutricionais que podem ser utilizadas na alimentação de homens e animais, dentre outras aplicações, devem ser estudadas quanto à sua capacidade de sobrevivência sob condições de alagamento, bem como os aspectos fisiológicos que as levam a suportar tais condições.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do alagamento sobre o crescimento vegetativo, o metabolismo anaeróbico e o sistema antioxidante em *Sesbania virgata*, *Polygonum acuminatum* e *Melinis minutiflora*, visando à obtenção de dados que auxiliem no processo de seleção de plantas para a revegetação de áreas alagadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Durante o seu ciclo de vida, as plantas podem passar por períodos de deficiência de oxigênio em suas raízes que, dependendo do tempo e da intensidade, podem levá-las à morte. As causas mais frequentes desse estresse abiótico na rizosfera são o excesso de chuvas ou irrigação e solos mal drenados ou compactados (Alves et al., 2000), grandes extensões de terras às margens de rios, lagos ou represas hidrelétricas que estão sujeitas a períodos intermitentes de alagamento (Oliveira et al., 1999).

A inundação parcial ou total do solo é prejudicial para o desenvolvimento da maioria dos vegetais, inibindo o crescimento e, em casos mais severos, pode resultar em morte da planta. Algumas espécies, entretanto, possuem notável capacidade de tolerar ou, até mesmo, resistir a estas condições, podendo crescer vigorosamente em resposta ao alagamento (Costa et al., 2006). Tais espécies possuem estratégias adaptativas a este estresse, garantindo, com isso, a abundância e a diversidade em solos inundáveis nos diferentes ecossistemas (Bailey-Serres & Voisenek, 2008).

As práticas de conservação visam diminuir a intensidade dos processos de erosão, fundamentando-se na manutenção da cobertura vegetal. O impacto direto da água no solo causa desagregação de suas partículas, tornando-as mais vulneráveis ao arraste mecânico causado pelo escoamento superficial das águas. Geralmente, os maiores problemas de erosão ocorrem nos primeiros anos de implantação de espécies arbóreas, pois elas se apresentam pouco desenvolvidas e, assim, produzem uma cobertura insuficiente do solo. Neste caso, as técnicas mais recomendadas incluem plantio de leguminosas intercaladas com espécies arbóreas, servindo, assim, como adubos verdes (Wadt, 2003).

As raízes, em geral, obtêm oxigênio (O_2) suficiente para a respiração aeróbica diretamente do espaço gasoso no solo, em um solo bem drenado e bem

estruturados, permitem a difusão de O_2 em maior profundidade (Voesenek et al., 2006). Entretanto, sob condições de alagamento, a difusão do O_2 no solo se torna muito baixa, gerando um ambiente hipóxico (deficiência de O_2), que pode facilmente se tornar anóxico (ausência de O_2) pela respiração de microrganismos e órgãos vegetais submersos. Isso pode provocar distúrbios metabólicos nas plantas, diminuindo o seu crescimento vegetativo, prejudicando o crescimento reprodutivo e, se o período for mais prolongado, pode levar a planta à senescência e à morte (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

A anoxia, ou hipoxia, sofrida pelo sistema radicular em plantas inundadas em um primeiro momento, provoca queda imediata na respiração das raízes (Liau & Lin, 1995), inibindo a produção de ATP e o consequente suprimento de energia para o crescimento e o desenvolvimento geral da planta. A fim de suprimir o déficit de energia promovido pelo alagamento, algumas espécies redirecionam as vias metabólicas para garantir a produção extra de ATP por meio do aumento na taxa de fermentação (Kumutha et al., 2008).

Na ausência do O_2 , o piruvato produzido pela glicólise é inicialmente fermentado a lactato. A produção de prótons pela glicólise e outras rotas metabólicas, assim como o decréscimo da translocação de prótons através da membrana plasmática e tonoplasto, leva a uma diminuição do pH citosólico. Na sequência, com pH mais baixo, a atividade da desidrogenase láctica (LDH) é inibida e a da descarboxilase do piruvato (PDC) ativada, gerando, com isso, um aumento na atividade da desidrogenase alcoólica (ADH) e, como consequência, um aumento na produção de etanol com o concomitante decréscimo na produção de lactato. A indução da ADH permite que a glicólise continue a produzir piruvato, bem como a reciclagem do NAD^+ . A rota de fermentação do etanol ao consumir mais prótons que a rota do lactato faz com que o pH citossólico aumente, acentuando assim a capacidade da planta sobreviver sob anoxia (Ricard et al., 1994), uma vez que a acidificação do citoplasma é um dos

maiores determinantes da intolerância à deficiência de O_2 (Drew, 1997). Apesar destas vantagens, a produção de ATP é 18 vezes menor. Isto, no entanto, garante, em muitos casos, um nível de energia mínimo, essencial à manutenção da vida da planta.

A fermentação de carboidratos permite manter a produção de ATP na ausência de O_2 , embora com uma produção de energia reduzida, pois, na fermentação, produzem-se somente duas moléculas de ATP por molécula de glicose, em vez de 36 moléculas produzidas pelo metabolismo aeróbico. O baixo rendimento energético do metabolismo anaeróbico, geralmente, é compensado pela aceleração da glicólise, o chamado “efeito Pasteur”, para satisfazer às exigências por ATP (Summer et al., 2000). Em algumas plantas sob hipoxia, há uma eficiente mobilização de polissacarídeos de reserva, especialmente na parte aérea, promovendo aumento na taxa glicolítica nos tecidos. Entretanto, muitas espécies diminuem o metabolismo ao nível mínimo, apenas para a manutenção da sua sobrevivência.

A falta de O_2 interfere diretamente na respiração, no âmbito de transporte de elétrons, paralisando a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, levando à redução na carga energética e ao retardo na atividade metabólica (Mustroph & Albrecht, 2007). A saturação da cadeia oxidativa com elétrons resulta no acúmulo de NADPH e NADH. Altos níveis de equivalentes redutores, baixa carga energética e componentes da cadeia de transporte de elétrons saturados oferecem condições favoráveis para a formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) (Biemelt et al., 1998). Em face da espontaneidade das reações em organismos adaptados ao modo de vida aeróbico, o aparecimento de radicais livres intracelulares é normal, durante o ciclo de vida das plantas. Esses radicais, no entanto, passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando há aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes oxidantes, resultando em estresse oxidativo (Resende et al., 2003).

O aumento de EROs é comumente observado sob determinadas condições de estresse, quando o equilíbrio da sua formação e detoxificação não pode ser mantido. Dentre as principais EROs que causam danos celulares pela oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, destacam-se o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o O_2 singlete (1O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (Pastori & Foyer, 2002; Apel & Hirt, 2004; Neill et al., 2008).

O O_2 molecular é relativamente não reativo e não tóxico, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As EROs podem ser geradas dentro das células como resultado da excitação ou um “leve toque” no elétron externo, formando 1O_2 , ou de uma sucessiva adição de elétrons ao O_2 molecular, produzindo O_2^{*-} , H_2O_2 e OH^\cdot . Por serem eletronicamente instáveis, estas moléculas são altamente reativas com um grande número de compostos, retirando um elétron a fim de se estabilizar (Elstner, 1987). Com a perda desse elétron cria-se um novo radical livre, que irá deflagrar uma reação em cadeia, caracterizando, com isso, o estresse oxidativo, lesando seriamente vários componentes celulares, dentre eles, lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Smirnov, 1993).

Em plantas, está bem caracterizado que, sob condições alagamento do solo, ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células. De acordo com Blokhina et al. (2003), o acetaldeído, normalmente acumulado sob essa condição estressante, pode funcionar como doador de elétrons ativando o O_2^{*-} que, ao sofrer dismutação pela ação da dismutase do superóxido (SOD), forma H_2O_2 , cujo nível (desintoxicação) é regulado pela catalase, por diversas peroxidases e pelo ciclo ascorbato-glutationa. Esse ciclo é caracterizado por uma série de reações redox acopladas, envolvendo enzimas peroxidase do ascorbato

(APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathiona (GR) (Jiménez et al., 1998).

Para sobreviver ao alagamento, os organismos que possuem um modo de vida aeróbico desenvolveram sistemas de remoção das EROs. O sistema antioxidante enzimático é de fundamental importância para aumentar a tolerância da planta ao estresse. Dentre as principais enzimas, a SOD, a catalase (CAT) e a APX são as que têm recebido maior atenção, no que concerne a esse mecanismo de proteção (Apel & Hirt, 2004). Adicionalmente, mecanismos antioxidantes não-enzimáticos, caracterizados pelo acúmulo de antioxidantes de baixo peso molecular, como glutathiona, ascorbato e carotenoides, também são capazes de neutralizar a ação tóxica dos radicais livres (Salisbury & Ross, 1992).

A primeira enzima que faz parte do sistema antioxidante enzimático é a SOD, considerada uma enzima chave, uma vez que, além de remover o ânion superóxido (O_2^*), é capaz de controlar outras EROs (Bowler et al., 1992). Esta enzima está presente em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (Bowler et al., 1992). Yan et al. (1996), trabalhando com milho alagado, observaram que, em níveis de O_2^* elevados, as atividades da SOD e de outras enzimas antioxidantes aumentaram, já no primeiro dia de alagamento.

O H_2O_2 pode ser produzido pela ação da SOD ou pela β -oxidação. Nestes casos, o H_2O_2 é principalmente detoxificado pela CAT, enquanto que em outros compartimentos subcelulares ele pode também fazer parte da reação da APX. Sendo assim, o nível de H_2O_2 na célula é regulado enzimaticamente por um arranjo da CAT, da APX e da peroxidase do guaiacol (POD), localizadas em quase todos os compartimentos celulares (Willekens et al., 1995; Asada, 1997; Asada, 1999).

A CAT e a APX localizam-se, predominantemente, em peroxissomas, entretanto, podem ser encontradas também no citosol, em mitocôndrias ou em

cloroplastos (Cakmak et al., 1993; Willekens et al., 1995). Uma redução na atividade da APX pode provocar um aumento das EROs e induzir danos oxidativos, prejudicando o desenvolvimento da planta (Shi et al., 2008). Esta enzima utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, gerando monodehidroascorbato, que pode ser diretamente reduzido a ascorbato pela ação da MDHAR (Polle & Rennenberg, 1993; Asada, 1999; Shigeoka et al., 2002), formando ascorbato e dehidroascorbato. Este dehidroascorbato é reduzido a ascorbato enquanto a glutatona é oxidada por meio da ação da DHAR (Asada, 1999).

A glutatona reduzida é um tripeptídeo abundante em tecidos de plantas e além de, juntamente com sua forma oxidada, manter um balanço redox nos compartimentos celulares, atua na eliminação do H_2O_2 citosólico e reage não-enzimaticamente com outras EROs, como $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} (Blokina et al., 2003). Apesar disso, sua maior importância no sistema antioxidante está em sua habilidade em regenerar outros antioxidantes, como o ácido ascórbico. Tal função ocorre via ciclo ascorbato-glutatona, em que sua redução é realizada pela redutase da glutatona (GR). A GR está presente no cloroplasto e no citosol (Asada, 1997) e mantém alta razão de glutatona reduzida/glutatona oxidada. A GSSG neste processo é regenerada pela GR, com gasto de NADPH que, por sua vez, é recuperado pela glicose-6-fosfato desidrogenase, mantendo-se assim o nível de glutatona reduzida (Polle & Rennenberg, 1993).

A indução da peroxidação de lipídios é um dos efeitos mais danosos das EROs e um indicativo de sua produção, devido à sua reação com ácidos graxos insaturados, causando a ruptura de membranas essenciais da plasmalema ou de organelas intracelulares, formando compostos como o malondialdeído (MDA) (Scandalios, 1993).

Apesar de os organismos aeróbicos disporem de vantagens energéticas significativas utilizando o O_2 molecular como um oxidante terminal na

respiração, a presença do O₂ no ambiente celular constitui uma ameaça oxidativa constante às suas próprias estruturas e processos, devido ao seu potencial de agir como redutor parcial e, assim, formar as EROs (Mallick & Mohn, 2000) que podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada. A formação de EROs é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos aeróbicos e provoca estresse oxidativo devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (Rice-Evans et al., 1991).

Todas as alterações que ocorrem na planta sob alagamento parecem estar relacionadas aos mecanismos de tolerância, levando a um ajustamento metabólico e morfoanatômico que permite às plantas sobreviverem por períodos mais prolongados em condições de hipoxia (Drew, 1997; Pereira et al., 2008).

As plantas em condições de alagamento podem produzir o aerênquima, que é um tecido especializado em armazenamento de oxigênio, produzido pela apoptose celular desencadeada pelo etileno (Drew, 1997). Outro parâmetro radicular que pode ser alterado com o alagamento é a porosidade das raízes, que está relacionada à difusão de gases pelos tecidos (Insausti et al., 2001). O desenvolvimento do aerênquima leva à formação de espaços intercelulares, conectados ao longo do eixo da raiz, que facilitam a difusão de gases (Gunawardena, 2008) e, conseqüentemente, permitem melhor distribuição do O₂ nos tecidos das plantas (Pereira et al., 2008).

O desenvolvimento do aerênquima em plantas surge pelo afastamento (aerênquima esquisógeno) entre células na região da lamela média, formando grandes espaços intercelulares, como também é resultado da hidrólise da parede celular e eventual lise celular (aerênquima lisógeno), promovida por etileno endógeno (Cutter, 1978). *Ranunculus repens* apresentou maior desenvolvimento de aerênquimas em estudo realizado com quatro espécies de ranunculáceas (He et al., 1999). Em estudo realizado com plântulas de milho cv. Saracura-BRS 4154, a hipoxia induziu o desenvolvimento de grandes espaços intercelulares,

formando aerênquima lisígeno, tanto em raízes como em coleóptiles, devido ao aumento na atividade de celulase (Dantas et al., 2001).

Estudos demonstraram que a tolerância à submersão em genótipos de arroz foi distinguida por uma alta taxa inicial de glicólise, que diminuiu com a continuação do estresse. Após um prolongado período de submersão, essas plantas possuíam menor taxa de crescimento, grande quantidade de amido e carboidratos solúveis, e menores níveis de aldeído que cultivares sensíveis (Singh, 2001). Assim, uma habilidade para limitar o consumo de carboidratos é benéfica para tolerância à submersão, nestas plantas. Há um requerimento para a conservação de energia que envolve ajustamentos na expressão gênica, metabolismo de carboidratos e produção de ATP. Para que a planta sobreviva em caso de baixa disponibilidade de O₂, é necessário um balanço entre a quebra de reservas para produção de ATP, pois isso pode levar à produção de EROS, que é prejudicial à planta (Fukao & Bailey-Seres, 2004).

A espécie *Sesbania virgata*, pertencente à família Fabaceae, caracteriza-se por ser uma planta perene, ereta, arbustiva, muito ramificada, que possui folhas compostas (Lorenzi, 2000). É considerada tolerante ao alagamento, pois pode sobreviver em regiões nas quais a água atinge altura de 1 a 2 m, por várias semanas, podendo ser utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas, uma vez que suas sementes apresentam dormência tegumentar (Roberts, 1981). Pode ser encontrada em margens de estradas, campos alagáveis e terrenos baldios. Desenvolve raízes adventícias e formação de aerênquima, como forma de adaptação (Shiba & Daimon, 2003). A espécie tem vida curta, de 8 a 9 anos, com capacidade moderada de competir com gramíneas e rebrotar da cepa após corte ou fogo. Trata-se de uma planta de interesse para revegetação de áreas degradadas, sendo utilizada com sucesso em ambiente ciliar (Pott & Pott, 1994).

Polygonum acuminatum, planta pertencente à família Polygonaceae, é uma planta herbácea que atinge aproximadamente 1m de altura, possui folhas simples, opostas, glabras, inflorescências racemosas e flores brancas. Difere das outras espécies de *Polygonum*, por ser mais vigorosa. Pode ser encontrada em brejos e locais alagados e banhados, sendo considerada tolerante ao alagamento (Moraes et al., 2001).

Melinis minutiflora é uma gramínea nativa da África que foi introduzida no Brasil com a finalidade de atuar como forrageira e formar pastagens por ser uma planta rústica e de rápido crescimento. Reproduz-se tanto por semente como vegetativamente (Martins et al., 2004). Ocorre com muita frequência nas áreas de pastagens da maioria dos estados da região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, sendo sensível ao alagamento. As sementes podem apresentar uma ligeira dormência até um mês após a colheita, podendo ser armazenadas por até seis meses (Andrade, 1983).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Neste trabalho foram utilizadas as espécies *Sesbania virgata* (sesbania), *Polygonum acuminatum* (erva-de-bicho) e *Melinis minutiflora* (capim-gordura), por fazerem parte de um estudo de revegetação ciliar do Alto Rio Grande e margens dos reservatórios das usinas de Itutinga e Camargos, MG.

3.2 Obtenção das plantas

As sementes de sesbania, cedidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, foram lavadas com hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v), por 10 minutos, envolvidas em papel de germinação tratado com Benlat[®] a 0,1% (m/v) para evitar contaminação

fúngica, e colocadas para germinar, em câmara de germinação úmida (modelo Mangelsdorss) no escuro, com temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. O período de germinação foi de cinco dias, sendo selecionadas as plantas mais vigorosas que foram transferidas para sacos plásticos com capacidade para 1L, contendo uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção de 1:1:1 e mantidas em casa de vegetação.

Sementes de erva-de-bicho e capim-gordura, coletadas no câmpus da UFLA, foram lavadas com hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v), sendo, em seguida, colocadas para germinar, por 15 dias, em bandejas contendo Plantmax[®]. As plantas foram transferidas para sacos plásticos com capacidade para 1L, contendo uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção de 1:1:1 e mantidas em casa de vegetação.

3.3 Condições ambientais do experimento

Plantas contendo seis folhas completamente expandidas foram colocadas em tanques de alvenaria (4m x 1m x 0,8m de comprimento, largura e altura, respectivamente) e submetidas a três diferentes condições: controle (não alagado), alagamento somente das raízes (nível de água até a altura do coleto) e completa submersão das plantas (totalmente alagadas). Os tanques foram cobertos com sombrite, com 30% de interceptação da radiação solar.

As avaliações foram realizadas no dia da indução do estresse e após 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias para sesbania; 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias para erva-de-bicho e 1, 2, 3, 4 e 5 dias para capim-gordura. A definição dos períodos de submersão foi baseada em testes realizados antes da montagem do experimento. Após cada período, plantas foram retiradas da submersão e colocadas em ambiente normóxico, mantendo-se o solo com nível de umidade próximo à capacidade de campo. Aos 15 dias de retorno a esta condição, foi avaliada a sobrevivência das plantas, baseando-se no enverdecimento, desenvolvimento de brotos e vigor vegetativo. As demais plantas foram

utilizadas para as análises de crescimento, enzimáticas, bioquímicas e anatômicas. Para tanto, foram coletadas amostras de raízes e folhas que foram imediatamente armazenadas a -80°C , para posterior análise. O delineamento experimental foi blocos ao acaso, com três repetições para cada período de coleta.

3.4 Crescimento vegetativo

Para as avaliações do crescimento vegetativo foram quantificadas as massas fresca e seca de folhas, caules e raízes. Adicionalmente, foram avaliados também o número de folhas, o comprimento das raízes e a altura das plantas. As alturas das plantas de sesbania e erva-de-bicho foram avaliadas medindo-se a distância entre o coleto e o ápice caulinar, e, para o capim-gordura, mediu-se a distância entre a região do coleto e a lígula da folha mais jovem.

3.5 Carboidratos

Os carboidratos solúveis foram extraídos da massa seca de folhas e raízes pela homogeneização de 300 mg de massa seca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, seguido de banho-maria por 30 minutos a 40°C . O homogenato foi centrifugado, a $5.000 \times g$ por 10 minutos, coletando-se o sobrenadante. O processo foi repetido por duas vezes e os sobrenadantes combinados.

Para a extração do amido, o pellet da centrifugação anterior foi novamente ressuspensionado em 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8 e colocado em banho-maria, a 100°C , por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL da solução da enzima amiloglucosidase, contendo 12,6 unidades e novamente incubado em banho-maria, a 40°C , por duas horas. Após a centrifugação a $5.000 \times g$ por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 15 mL.

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais (AST) e do amido, utilizou-se o método da Antrona (Dische, 1962). A quantificação dos açúcares redutores (AR) seguiu o protocolo descrito por Miller (1959), através de DNS.

3.6 Atividades enzimáticas

3.6.1 Enzimas do metabolismo anaeróbico

3.6.1.1 Desidrogenase alcoólica e Desidrogenase láctica

Para a atividade da desidrogenase alcoólica (ADH) e desidrogenase láctica (LDH), 200 mg de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), glicerol 15% (v/v), β-mercaptoetanol 10 mM e PVPP 6% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 x g, por 15 minutos, a 4°C, coletando-se o sobrenadante para a incubação (Yamanoshita et al., 2005). Aliquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas a um tampão de incubação específico para cada enzima. O tampão de incubação para a ADH foi composto por Tris-HCl 150 mM (pH 8,0) e NAD⁺ 0,3 mg mL⁻¹, incubando-se a 30°C, por 15 minutos, adicionando-se 1% de etanol (v/v) na hora da leitura, realizada em espectrofotômetro, a 340 nm, durante três minutos, acompanhando-se a redução do NAD⁺. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NADH produzido por minuto de incubação. Para a LDH, utilizou-se tampão de incubação composto por Tris-HCl 150 mM (pH 8,0), NAD⁺ 0,3 mg mL⁻¹ e cloreto de magnésio 1,25 mM, incubando a 30°C, por 30 minutos. Adicionou-se, ainda, lactato de sódio 60%, na hora da leitura no espectrofotômetro, sendo realizada nas mesmas condições que a ADH.

3.6.1.2 Descarboxilase do piruvato

Para a atividade da descarboxilase do piruvato (PDC), 300 mg de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados no tampão de

extração contendo Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), ascorbato de sódio 10 mM, DTT 10 mM, BSA 50 mmol L⁻¹ e 5% de glicerol (v/v). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 20 minutos, a 4°C. Para a incubação, utilizaram-se tampão composto por MES 85 mM (pH 6,5), tiamina pirofosfato 0,5 mM, cloreto de magnésio 0,5 mM, NADH 0,15 mM e 14 unidades de ADH. Adicionaram-se extrato enzimático e piruvato de sódio 10 mM na hora da leitura no espectrofotômetro. Nesta reação, o acetaldeído produzido pela PDC foi reduzido pela ADH, oxidando o NADH, sendo monitorado a 340 nm, por 3 minutos (Kato-Noguchi, 2000).

3.6.2 Enzimas do metabolismo antioxidante

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados no seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 1 mM. Os homogeneizados foram centrifugados a 13.000 g, por 20 minutos, a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathiona (GR) (Biemelt et al., 1998).

3.6.2.1 Dismutase do superóxido

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977) em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: %

de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

3.6.2.2 Catalase

A CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM, incubado a 28°C, em que foi monitorado o consumo do peróxido de hidrogênio (Havir & McHale, 1987).

3.6.2.3 Peroxidase do ascorbato

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM.

3.6.2.4 Redutase do dehidroascorbato

A atividade da DHAR foi realizada segundo Nakano & Asada (1981), em que o tampão de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, glutatona reduzida 2,5 mM, dehidroascorbato (DHA) 0,2 mM e EDTA 0,1 mM foi colocado em banho-maria, a 28°C, e a leitura realizada a 265 nm, observando-se o aumento na absorbância, que indicava a formação de ascorbato (Nakano & Asada, 1981).

3.6.2.5 Redutase da glutatona

Para atividade da GR, foi utilizado o método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH por meio do decréscimo na

absorbância a 340 nm por 3 minutos. O meio de incubação foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutathiona oxidada 1 mM e NADPH 75 μ M.

3.7 Avaliações bioquímicas

3.7.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege & Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram adicionados ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA), incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação:

$$[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b),$$

em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1)

A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

3.7.2 Peróxido de hidrogênio

Cem miligramas de tecido radicular foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados, a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em

um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (Velikova et al., 2000).

3.7.3 Ascorbato e dehidroascorbato

Ascorbato (Asc) e dehidroascorbato (DHA) foram determinados conforme descrito por Arakawa et al. (1981), com algumas modificações. Cem miligramas de tecido radicular foram macerados em TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. Ascorbato total (Asc + DHA) foi determinado após a redução do DHA pelo dithiothreitol (DTT). Trinta microlitros do sobrenadante foram adicionados ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), DTT 0,06% (m/v) e fosfato de sódio 0,2 M, pH entre 7 e 8 (ajustado com NaOH 1,2 M). Após incubação em temperatura ambiente, por 10 minutos, foi adicionado *N*-ethylmaleimide 0,24% (m/v) e o pH de cada tubo aferido e ajustado entre 1 e 2, pela adição de TCA 20% (m/v). Em seguida, adicionaram-se ácido fosfórico (H₃PO₄) 4% (v/v), bathophenanthrolina 0,5% (p/v) e FeCl₃ 0,03% (m/v), homogeneizando-se a mistura vigorosamente e incubando-a, a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm.

O ascorbato foi determinado conforme já descrito, substituindo-se o DTT por etanol 95% em igual volume. Os valores de DHA foram obtidos pela diferença entre os valores de ascorbato total e ascorbato. Todas as soluções foram preparadas em etanol 95%, exceto o TCA e o fosfato de sódio.

3.8 Gel de atividade

A atividade das enzimas ADH, SOD e CAT também foi avaliada pelo método PAGE não-desnaturante em gel de poliacrilamida 10%. Os extratos enzimáticos foram quantificados pelo método de Bradford (1976), sendo aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta do gel. Após a corrida a 100 V, a incubação e a revelação do gel foram realizadas conforme Alfenas (2004). O gel

da ADH foi incubado, a 37°C, no escuro, por 30 minutos, em 50 mL de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), contendo 15 mg de NAD⁺, 2 mg de PMS, 10 mg de MTT e 3 mL de etanol 95%.

Para a SOD, incubou-se o gel a 30°-37°C exposto à luz até o surgimento das bandas em 100 mL de tampão Tris HCL (pH 8,5) 0,05M, contendo 4 mg de riboflavina, 300 mg de EDTA e 20 mg de NBT. O gel de atividade da CAT foi incubado, por 5 minutos, em solução de H₂O₂ 0,01% (v/v), sob agitação. Em seguida, foi lavado com água destilada e incubado em uma solução de ferrocianeto de potássio 1% (m/v) e cloreto de ferro 1% (m/v), até o surgimento das bandas.

3.9 Avaliações anatômicas

Para a avaliação das características anatômicas, raízes das plantas em cada condição de crescimento foram coletadas e fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico), por 72 horas e, posteriormente, conservadas em álcool 70% GL (Johansen, 1940).

Utilizou-se micrótomo de mesa para a obtenção das seções transversais das raízes. Para o preparo das lâminas, após lavagem em água destilada, as seções transversais foram coradas com uma mistura de azul de astra e safranina (Kraus & Arduin, 1997). Para a montagem das lâminas, utilizou-se glicerina 50% e as fotomicrografias foram feitas em microscópio Olympus BX-60 acoplado a uma máquina fotográfica modelo Canon Power Shot A620.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do alagamento sobre o crescimento e a sobrevivência das plantas

Ao final do período de 56 dias de avaliação do experimento, as plantas de sesbania alagadas somente nas raízes mantiveram um bom grau de enfolhamento, porém, em menor proporção que as plantas controle (Figura 1A). Já aquelas totalmente alagadas começaram a perder suas folhas a partir do sétimo dia após o início dos tratamentos, com desfolha total aos 28 dias.

Em relação ao tamanho, a sesbania, quando alagada, apresentou, ao longo do experimento, diferença expressiva no seu crescimento (Figura 1B). Esta diferença foi mais evidente a partir de quatro e três semanas, para as plantas alagadas nas raízes e totalmente alagadas, respectivamente. Ao final do período de estudo, houve um ganho médio em altura de 192% para aquelas que foram alagadas apenas no sistema radicular e de 126%, quando totalmente submersas. Neste mesmo espaço de tempo, as plantas controle obtiveram um acréscimo em altura de 82%. Estes resultados demonstram que a sesbania mostrou-se tolerante ao alagamento, mesmo quando totalmente alagada, uma vez que, apesar da desfolha, as plantas nesta condição continuaram a crescer em altura até o 21º dia. Entretanto, a limitação exposta ao crescimento pela perda das folhas a partir deste período, observada principalmente pela queda na produção de massa seca das plantas totalmente alagadas, demonstra a importância das folhas no processo de produção de esqueletos carbônicos necessários para a manutenção e o crescimento das plantas.

Erva-de-bicho alagada apenas nas raízes apresentou, à semelhança do controle, um aumento progressivo no número de folhas, alcançando, aos 21 dias, quando terminou o período de avaliação, um acréscimo de 64% no seu grau de enfolhamento (Figura 1C). Já as que foram totalmente alagadas enfolharam até nove dias após o início do estresse, quando começaram a amarelar e a perder

suas folhas gradativamente, chegando ao final do período de estudo com 78% do total inicialmente observado. Já em relação ao tamanho, observou-se que as plantas sob estresse obtiveram ganhos expressivos, notadamente a partir dos nove dias, chegando ao final do experimento com altura 4,6 e 5,1 vezes maior que as do início, respectivamente, para as alagadas nas raízes e totalmente alagadas (Figura 1D). No mesmo período, as plantas controle cresceram 2,3 vezes mais. Estes resultados demonstram que a desfolha parcial das plantas totalmente alagadas, ao contrário do observado para a sesbania, não chegou a prejudicar o seu crescimento em altura.

Para o capim-gordura, espécie considerada sensível ao alagamento, o enfolhamento das plantas começou a se diferenciar em função dos tratamentos já aos quatro dias do início do experimento (Figura 1E). Desse modo, aos cinco dias, quando o experimento foi finalizado, praticamente todas as plantas, independentemente do tratamento, mantiveram o enfolhamento, embora tenha ocorrido um discreto aumento em relação ao período inicial em proporções diferentes entre os tratamentos controle e alagado nas raízes na ordem de 33% e 11%, respectivamente. Nas plantas totalmente alagadas, o enfolhamento final foi semelhante ao inicial. Já para o crescimento em altura, as plantas ao final de período de avaliação apresentaram um pequeno acréscimo, proporcional ao nível de estresse, ou seja, as plantas alagadas nas raízes e totalmente submersas cresceram 11% e 28%, em relação ao período inicial (Figura 1F). Já as plantas controle mostraram um crescimento na ordem de 16%.

O crescimento da parte aérea representa uma resposta adaptativa importante de algumas plantas tolerantes à hipoxia (Bloom et al., 1993) e o etileno é o principal responsável pelo alongamento do caule em resposta à submersão, resultando no contato da parte aérea com a atmosfera. Este fitormônio é produzido continuamente na planta, mas, durante o alagamento, pode ser acumulado em grande quantidade, em razão do seu baixo coeficiente de

difusão na água, provocando senescência e abscisão precoce das folhas. Produção de raízes adventícias e formação de aerênquima em plantas cultivadas em solos hidromórficos também são creditadas à elevação nos níveis de etileno nestas plantas (Brailsford et al., 1993).

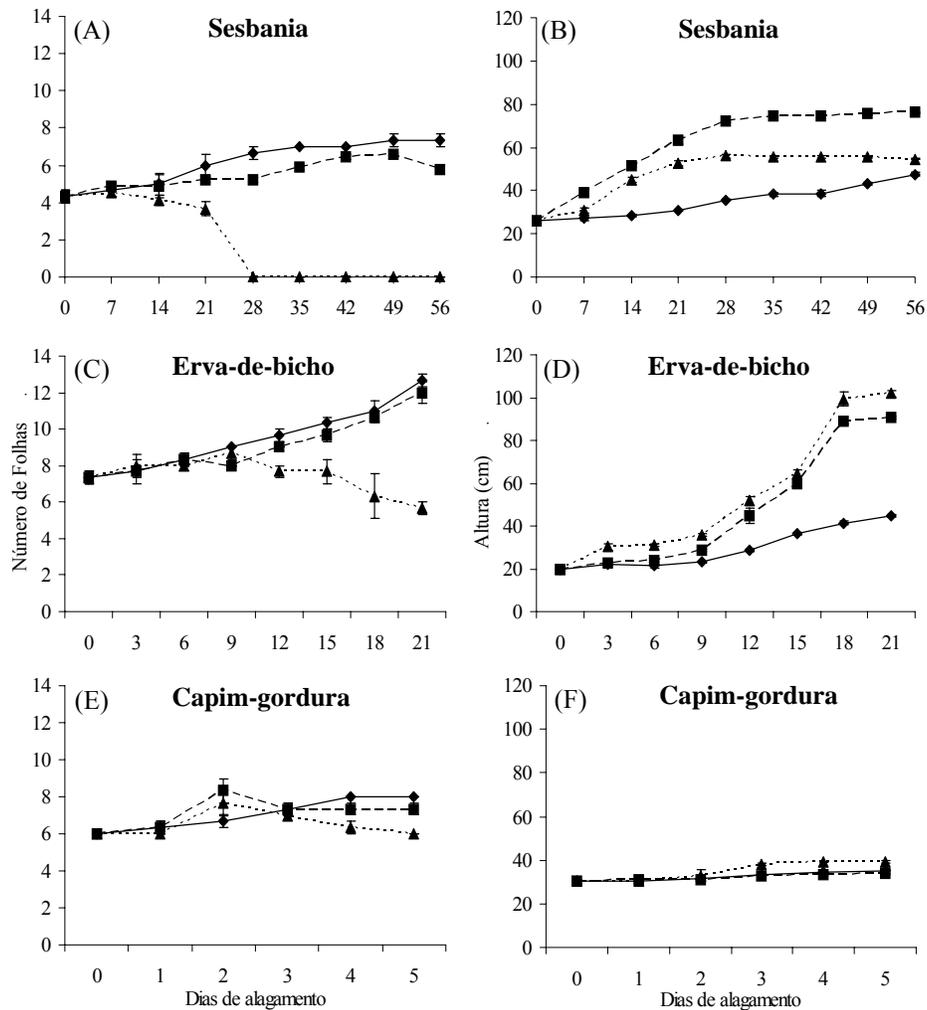


FIGURA 1 Número de folhas e altura de plantas submetidas ao alagamento. Controle (—◆—), plantas alagadas nas raízes (---■---) e plantas totalmente alagadas (···▲···). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

O comportamento da matéria seca das plantas (Figura 2), de maneira geral, refletiu os resultados obtidos com a análise do número de folhas e da altura das plantas (Figura 1). As plantas de sesbania do tratamento controle e sob alagamento das raízes aumentaram gradativamente a massa seca da parte aérea,

do início até o fim do experimento (Figura 2A) como resultado do enfolhamento e do crescimento em altura (Figura 1A). Neste ponto, é importante destacar que o acúmulo de massa seca da parte aérea em plantas submetidas ao alagamento nas raízes foi 80% superior ao observado no controle. Este fato mostra que a sesbania é uma espécie bastante tolerante ao alagamento na zona radicular, uma vez que consegue crescer em altura e emitir novas folhas em níveis mais elevados que as plantas em condições de normoxia.

Já as plantas totalmente submersas acumularam massa seca até o 21º dia e, a partir daí, decresceram gradativamente até o final do experimento, chegando a 40% daquele observado nas plantas controle. O acúmulo de matéria seca da parte aérea até os 21 dias de avaliação ocorreu tão somente devido ao desenvolvimento do caule, tanto no sentido lateral quanto longitudinal dentro deste período (Figura 1A) já que, no mesmo intervalo de tempo, não houve acréscimo no número de folhas (Figura 1B). Por outro lado, o decréscimo na matéria seca da parte aérea a partir dos 21 dias de experimento se deu em função da desfolha iniciada uma semana antes (Figura 1A).

Para a sesbania, o contínuo crescimento das raízes das plantas alagadas nas raízes, durante todo o período (Figura 2B), mostra que as folhas estavam fotossinteticamente ativas, com capacidade suficiente para manter o crescimento da parte aérea e ainda fornecer carboidratos para o crescimento radicular. O acréscimo da massa seca das raízes das plantas de sesbania alagadas parcialmente deve-se ao aumento significativo no número de raízes adventícias, sendo esse aumento verificado já na primeira avaliação, aos sete dias de alagamento. Essa formação de raízes adventícias em plantas alagadas foi relatada em muitos trabalhos, sendo esse fenômeno fortemente ligado a mecanismos adaptativos das plantas, correlacionados com o aumento da absorção de água, compensando o dano ao sistema radicular existente (Liao & Lin, 1995). Resultados semelhantes também foram observados por Shiba &

Daimon (2003), ao estudarem o comportamento de algumas plantas do gênero *Sesbania* submetidas a condições de alagamento, em que houve formação de raízes adventícias e aerênquima, como forma de adaptação. Estudos realizados com *Sebastiania comersoniana* (Kolb et al., 1998) e *Glycine max* (Thomas, 2004) também mostraram surgimento de raízes adventícias e aerênquimas em plantas com sistema radicular alagado.

A forte dependência das folhas no ritmo de crescimento do sistema radicular novamente pode ser ilustrada pela forte queda na matéria seca das raízes de plantas totalmente submersas a partir do 14º dia, justamente quando começou a ser observada a abscisão das folhas (Figura 1A). Neste caso, ao final do experimento, todas as raízes estavam quase mortas e, ao contrário do alagamento parcial, as plantas do tratamento totalmente alagado não apresentaram formação de raízes adventícias.

O acúmulo de matéria seca da parte aérea de erva-de-bicho (Figura 2C) foi constante e proporcional ao tempo do experimento e seguiu, para os três tratamentos, o mesmo padrão da altura das plantas e, à exceção das plantas submetidas ao alagamento total, o do número de folhas (Figura 1 C, D). É importante destacar que a desfolha das plantas deste tratamento, iniciada no nono dia, não levou a decréscimos na matéria seca. Este fato se deve ao crescimento em altura, que se acentuou exatamente a partir deste período. Estes resultados demonstram que o caule de erva-de-bicho possuía, ainda, reservas para a manutenção do crescimento nos 12 dias posteriores. A exemplo da *Sesbania*, a erva-de-bicho também mostrou alta tolerância ao alagamento parcial, durante os 21 dias de estudo. Esta afirmativa pode ser constatada por um aumento de 21% no acúmulo de matéria seca da parte aérea das plantas sob estresse parcial em relação ao controle. No caso das plantas totalmente submersas, ainda que a matéria seca, ao final do experimento, tenha sido 29% menor que a do controle, as plantas de erva-de-bicho estavam com ótimo vigor

vegetativo e com taxas de crescimento ainda crescente. Este fato revela uma tolerância intermediária desta ao alagamento total das plantas.

Para a erva-de-bicho (Figura 2D), os padrões de crescimento da parte aérea e raízes foram praticamente os mesmos, mostrando, mais uma vez, a interação parte aérea raiz.

Em relação ao capim-gordura, verificou-se que, nas plantas sob estresse, o alagamento prejudicou sensivelmente o acúmulo de matéria seca da parte aérea já a partir do segundo dia (Figura 2E). Este decréscimo na matéria seca da parte aérea, que ocorreu em função da desfolha que se iniciou após o terceiro dia de estresse, fez com que esta característica, ao final do período de estudo, estivesse 49% e 57% menor que a do controle nas plantas parcial e totalmente alagadas, respectivamente. Desse modo, das três espécies estudadas, o capim-gordura se mostrou a mais sensível ao alagamento.

Finalmente, para o capim-gordura (Figura 2F), o alagamento afetou drasticamente a massa seca das raízes, após o primeiro dia de estresse. Esta diminuição no crescimento radicular se deu antes que as plantas perdessem suas folhas, fato este que ocorreu somente no terceiro dia (Figura 1E). Neste caso em particular, outros fatores, que não a nutrição orgânica, podem ter contribuído para o colapso do sistema radicular.

A redução da matéria seca da raiz em função do alagamento é descrita em muitas espécies e, mesmo com o surgimento de raízes adventícias, observa-se o decréscimo da biomassa do sistema radicular. Isso porque o alagamento provoca a morte de muitas raízes, além do fato de que a biomassa das raízes adventícias é relativamente pequena, por apresentar aerênquima e espaços intercelulares (Santiago & Paoli, 2007).

Mielke et al. (2005), em estudo realizado com *Annona glabra*, uma espécie descrita pelos autores como altamente tolerante ao alagamento, verificaram que, num período de 56 dias, o alagamento promoveu aumentos

significativos na biomassa das raízes, caules e planta inteira, sem induzir sintomas de estresse. Da mesma forma, Santiago & Paoli (2007) verificaram aumento na biomassa das raízes e da parte aérea em *Genipa americana* submetida à hipoxia por seis meses, refletindo alta plasticidade e justificando a sua larga ocorrência em áreas sujeitas a alagamento periódico.

Em muitos estudos envolvendo estresse anaeróbico em plantas, a tolerância é determinada pelo índice de sobrevivência após o alagamento. A sesbania, em particular, demonstrou boa capacidade de sobrevivência após 42 dias de estresse, com 100% de sobrevivência dentro dos dois tratamentos alagados (Figura 3A). Em períodos de até 56 dias de estresse, houve uma redução de 55% no número de indivíduos sobreviventes no tratamento totalmente submerso. No caso do alagamento apenas das raízes, 100% das plantas suportaram os 56 dias de duração da pesquisa. Erva-de-bicho, independentemente do grau de pressão do estresse, comportou-se como espécie tolerante, com 100% de sobrevivência de todas as plantas, durante os 21 dias de alagamento (Figura 3B). Já o capim-gordura, quando submetido ao alagamento total, apresentou índice de sobrevivência de 33%, ao final de cinco dias do período experimental (Figura 3C), demonstrando sua baixa tolerância ao alagamento.

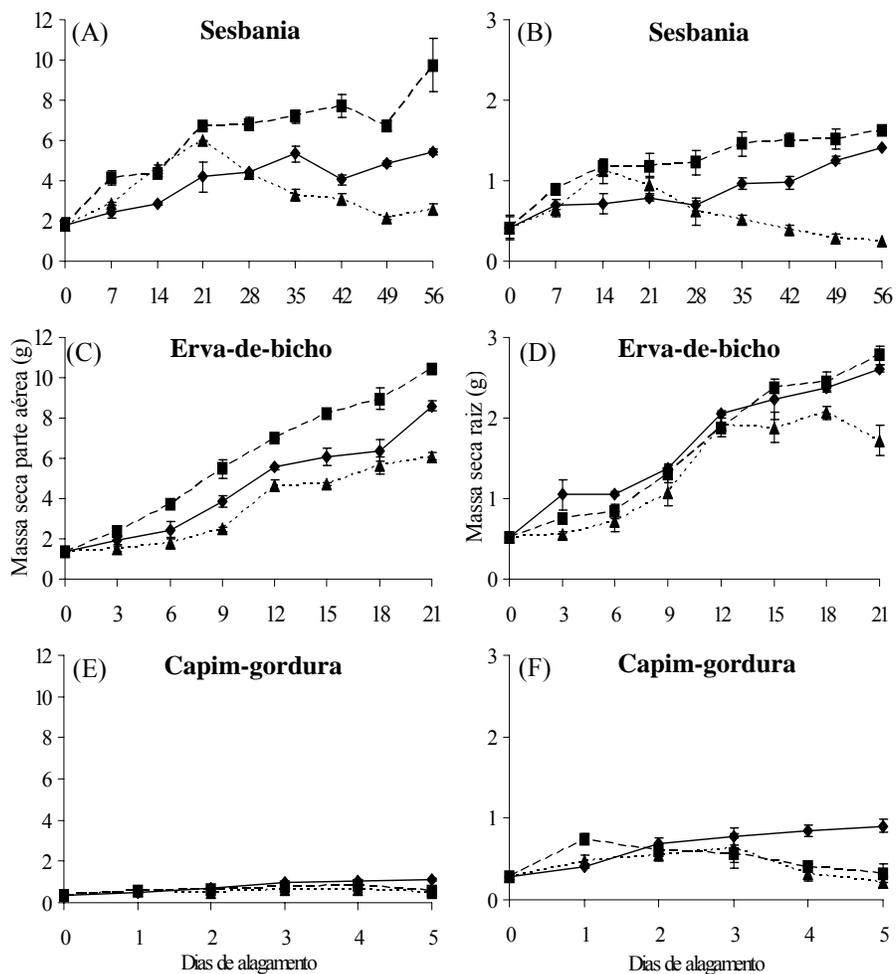


FIGURA 2 Massa seca da parte aérea e das raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (◆), plantas alagadas nas raízes (■) e plantas totalmente alagadas (▲). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

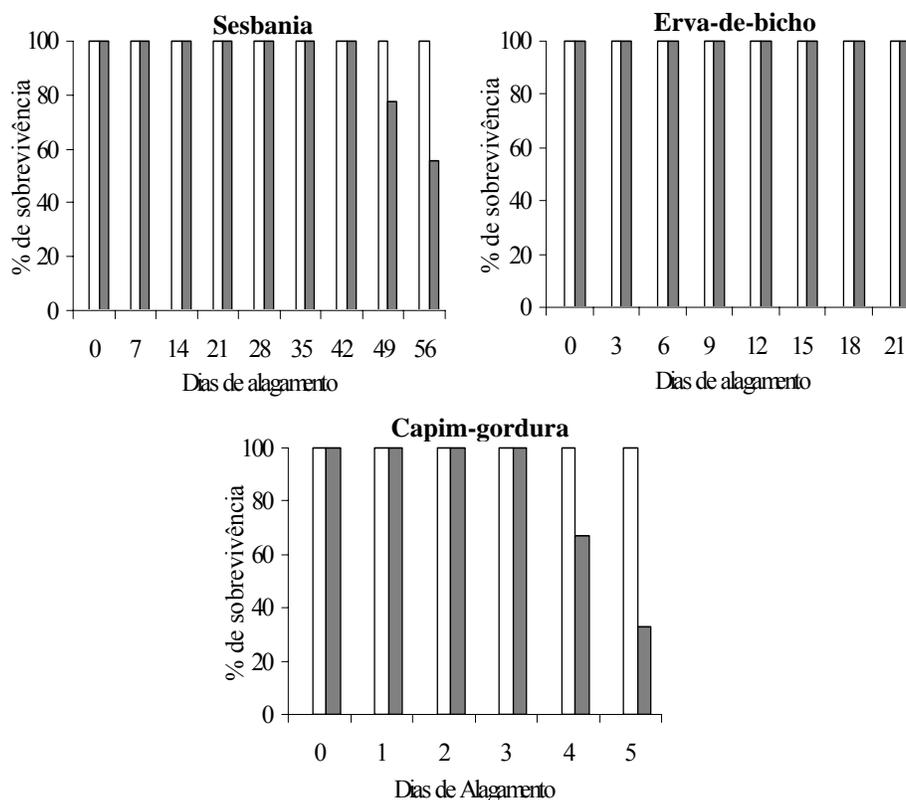


FIGURA 3 Sobrevivência de plantas após o alagamento. Plantas alagadas nas raízes (□) e plantas totalmente alagadas (■).

4.2 Carboidratos

A fim de investigar a possível relação entre teores de carboidratos com a tolerância das plantas ao alagamento, foram analisados os teores de amido, açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR), ao longo do período de avaliações. De maneira geral, para as três espécies submetidas ao alagamento, os teores de amido foliar e radicular foram menores que os do controle, notadamente após as primeiras avaliações (Figura 4). Estes resultados, provavelmente, se devem a uma queda na atividade fotossintética da plantas em função do estresse estabelecido (Davidson & Milthorpe, 1966). Comparando-se

os tratamentos alagados, verifica-se que os teores de amido nas folhas e raízes de plantas de sesbania totalmente alagadas foram inferiores àqueles observados no tratamento alagado nas raízes e, à medida que o estresse anaeróbico foi evoluindo, houve um decréscimo gradativo com o tempo de exposição a ele. Este decréscimo no teor de amido era de se esperar, uma vez que as plantas, no 21º dia de estresse, perderam todas as folhas (Figura 1A), refletindo, inclusive, na queda de produção de matéria seca das raízes (Figura 2A). O grande decréscimo no teor do amido em raízes de erva-de-bicho a partir do nono dia corrobora esta afirmação, uma vez que, neste período, iniciou-se a queda de folhas (Figura 1D) afetando negativamente o conteúdo de matéria seca das raízes, já aos 12 dias (Figura 2C).

Em geral, os carboidratos têm sua concentração reduzida por ocasião da desfolha, sendo essa redução diretamente proporcional à severidade e frequência de desfolha (Donaghy & Fulkerson, 1998). Gomide et al. (2002), em estudo realizado com capim-mombaça, observaram que a desfolha total da planta comprometeu seu sistema radicular e sua concentração de carboidratos totais. A redução ocorreu em todos os tratamentos de desfolha, mas foi mais intensa sob desfolha total, indicando que os assimilados gerados não foram suficientes para suprir o crescimento de novas folhas e a respiração da planta, sendo um indício de sua contribuição para a manutenção da planta após o corte.

Nas plantas parcialmente alagadas de sesbania, observou-se um aumento no teor de amido foliar a partir dos 21 dias, permanecendo, entretanto, em menores níveis que o do controle (Figura 4A). Nas folhas de plantas totalmente alagadas, o teor de amido foi sempre inferior aos demais. Quanto às raízes, o nível de amido nas plantas alagadas começou a cair a partir de 21 dias e mais severamente nas plantas totalmente submersas (Figura 4B). Resultados semelhantes foram observados por Dixon et al. (2006), em trabalho realizado com *Potamogeton pectinatus* sob anoxia.

O teor de amido em erva-de-bicho (Figura 4C-D) e em capim-gordura (Figura 4E-F) nas plantas alagadas foi sempre inferior ao controle, tanto em folhas quanto em raízes, havendo diminuição gradativa ao longo do experimento.

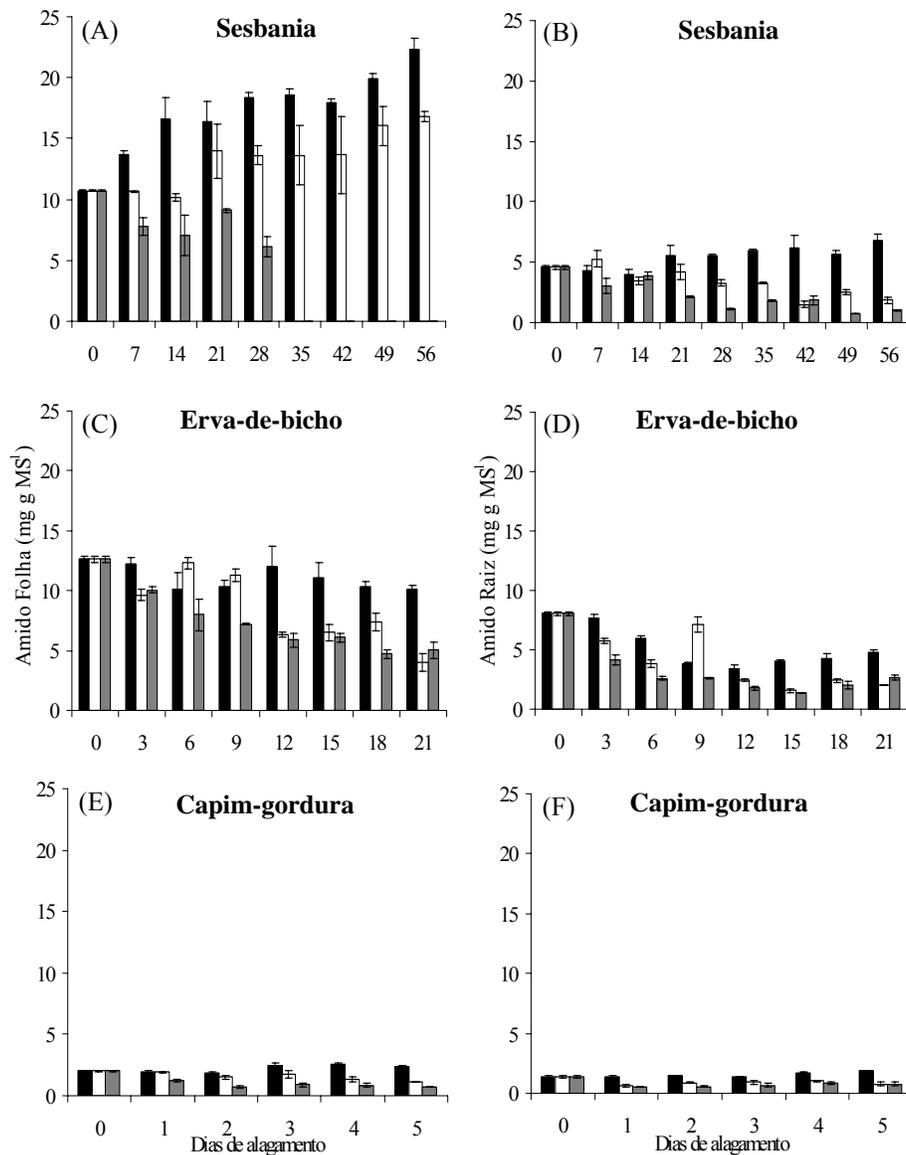


FIGURA 4 Teor de amido em plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (■). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

Quanto aos açúcares solúveis totais (AST), todos os teores deste carboidrato, em folhas de sesbania e erva-de-bicho, foram maiores em plantas

alagadas nas raízes que os do controle, em todos os períodos avaliados e, com a evolução do estresse, os mesmos foram aumentando em sesbania (Figura 5A) e diminuindo em erva-de-bicho (Figura 5B). Nas folhas de capim-gordura, diferenças significativas favoráveis às plantas do tratamento alagado nas raízes frente as do controle só puderam ser observadas nas três primeiras avaliações (Figura 5C). Nas plantas totalmente submersas, de maneira geral, os teores destes carboidratos foram menores que os do controle para a sesbania, maiores para erva-de-bicho e iguais no capim-gordura. Comportamento semelhante foi observado para os teores de açúcares redutores (Figura 6A, C e E).

Nas raízes, os teores de AST em sesbania alagadas foram caindo lentamente, permanecendo abaixo dos valores encontrados para o controle, a partir do 21º dia (Figura 5B). Para a erva-de-bicho (Figura 5D) e o capim-gordura (Figura 5F) alagados, os teores radiculares destes carboidratos sempre foram maiores que os do controle, em todo o período experimental. Neste mesmo órgão, os açúcares redutores (AR) em sesbania e erva-de-bicho alagados foram maiores que os do controle, em todas as avaliações (Figura 6B e D) e, no capim-gordura, comparativamente ao controle, foram maiores em raízes de plantas parcialmente alagadas e menores nas totalmente submersas (Figura 6F).

Em plantas de capim-gordura, verificou-se um aumento gradativo no teor de AST nas folhas de plantas parcialmente alagadas, enquanto que, no tratamento totalmente submerso, houve um pequeno aumento no terceiro dia, diminuindo em seguida (Figura 5E). Já nas raízes, esses açúcares aumentaram até o final do período experimental nas plantas alagadas (Figura 5F).

O acúmulo de açúcares solúveis em raízes de plantas sob alagamento do solo tem sido reportado como forma de tolerância a esse estresse (Liao & Lin, 2001). Assim, enquanto a planta está fotossinteticamente ativa, ela produz carboidratos para manter o metabolismo. Ao contrário, com a redução da fotossíntese, devido, inclusive, à queda das folhas, efeito observado nas plantas

totalmente alagadas, as reservas de carboidratos das diferentes partes da planta tendem a diminuir e levam, conseqüentemente, a planta à morte. Segundo Boamfa et al. (2005), um dos fatores que contribuem para as injúrias na submersão de plantas inclui a baixa quantidade de carboidratos de reserva e ausência da formação interna de O_2 , resultante da inibição da fotossíntese causada por uma diminuição da luz e CO_2 .

Quando se verificam os menores teores de amido (Figura 4), seguidos de também maiores teores de açúcares (Figuras 5 e 6), em folhas e raízes de plantas sob alagamento, percebe-se que, quando as plantas estão sob estresse, a síntese de carboidratos é direcionada para a formação de moléculas menores nas folhas, facilitando, assim, a translocação e o seu acúmulo nas raízes. Com isso, as plantas sob estas condições teriam maiores possibilidades de adaptação ao estresse, em função de um maior crescimento de raízes, a partir de uma maior disponibilidade de carboidratos prontamente assimiláveis. Entretanto, o que se observa é que, mesmo direcionando o metabolismo para a formação de pequenas moléculas, a sua quantidade possivelmente ainda ficava abaixo do requerido para a manutenção do crescimento radicular e a manutenção de raízes vivas. Isto explica a morte de raízes observadas nas plantas nesta condição (Figura 2), principalmente quando o alagamento era total.

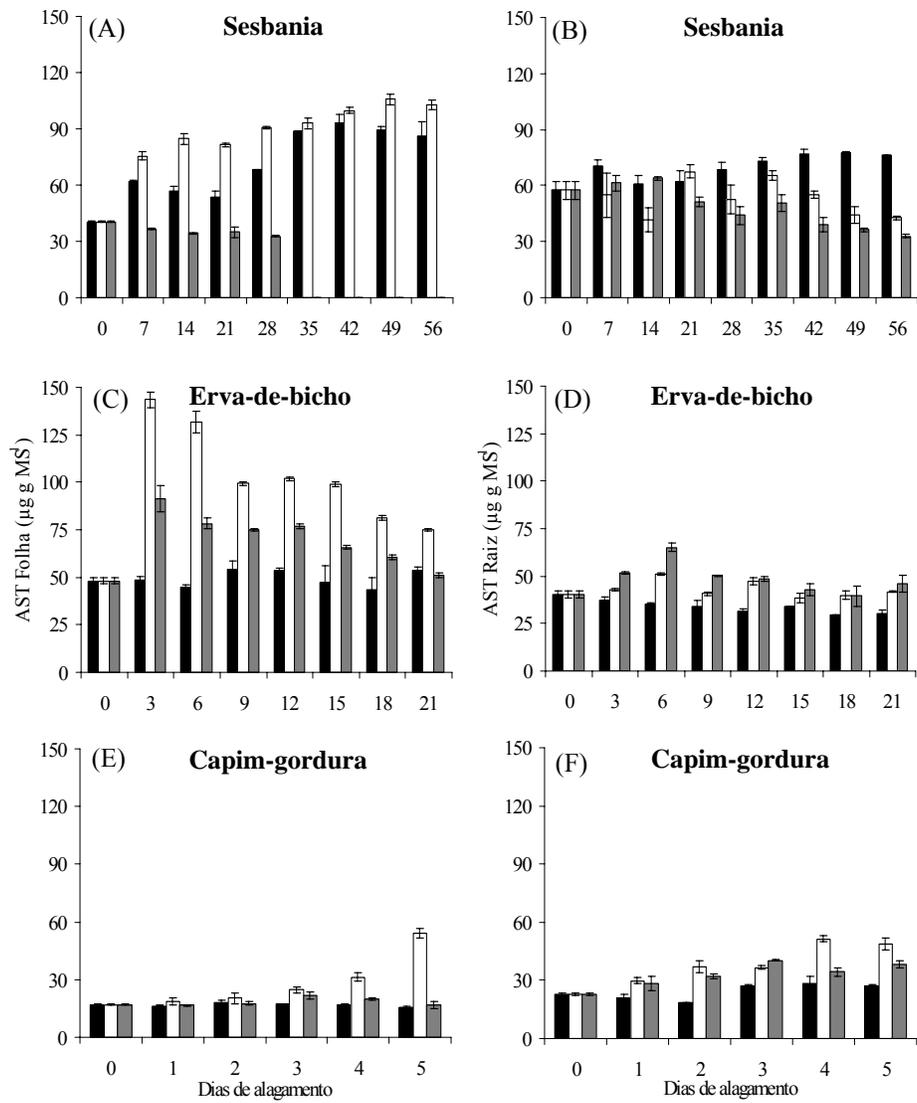


FIGURA 5 Teor de açúcares solúveis totais (AST) em plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

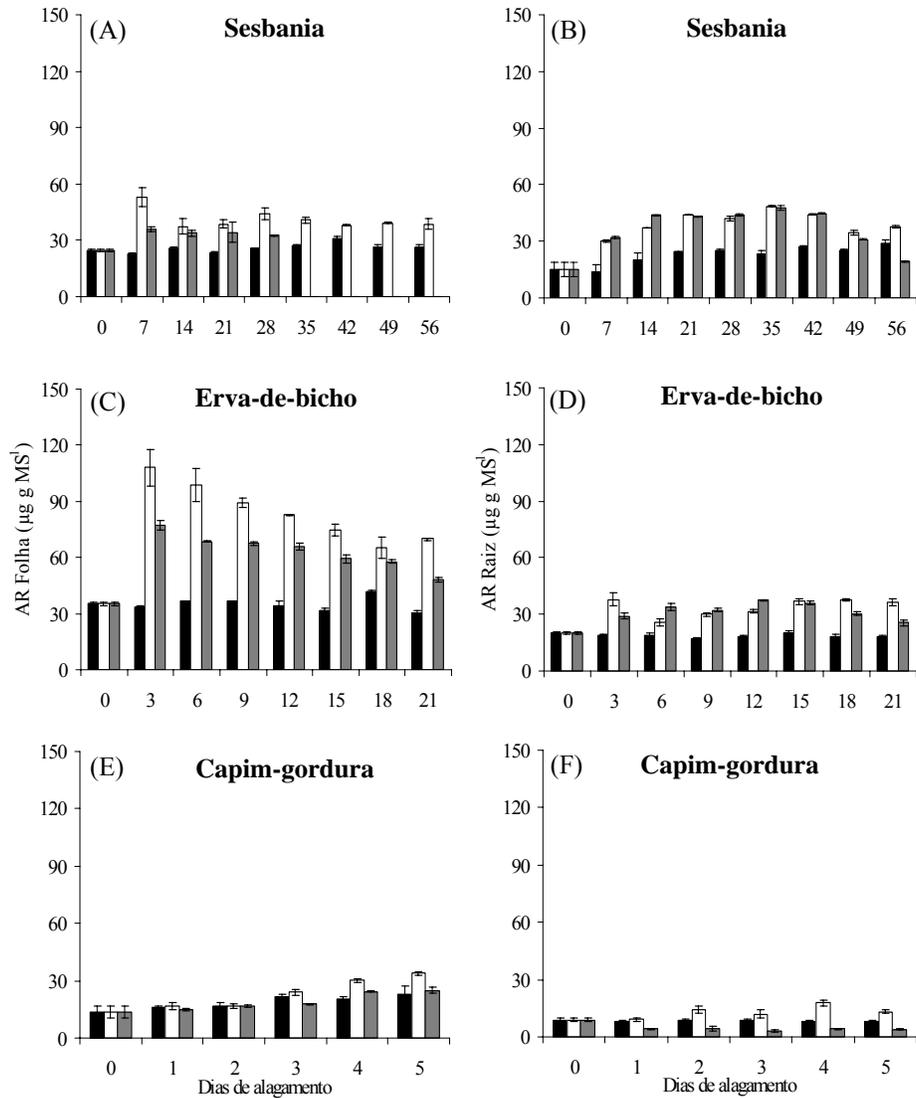


FIGURA 6 Teor de açúcares redutores (AR) em plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

4.3 Enzimas diretamente envolvidas no metabolismo anaeróbico

Muitos estudos têm revelado que o alagamento de plantas provoca queda imediata na respiração das raízes. Como resposta, algumas espécies redirecionam as vias metabólicas para garantir a produção extra de ATP por meio do aumento na taxa de fermentação (Kumutha et al., 2008). Neste trabalho, enzimas envolvidas neste processo foram investigadas. No caso da rota mediada pela LDH responsável pela produção de lactato em células que sofreram déficit de O₂, verifica-se que as três espécies expostas ao alagamento apresentaram taxas de atividade na raiz menores que as do controle e que não houve diferenças entre as atividades em plantas sob alagamento nas raízes e totalmente alagadas (Figura 7). Estes resultados mostram que esta rota anaeróbica não foi acionada como rota alternativa ao metabolismo aeróbico. Em estudos realizados com alface (Kato-Noguchi, 2000) e arroz (Kato-Noguchi & Morokuma, 2007), não foi observado nenhum aumento significativo na atividade de LDH. Isso é consistente com resultados que mostram que a hipoxia não aumenta a atividade da LDH em raízes e plântulas de arroz (Rivoal et al., 1991).

Uma vez que não houve desvio da rota no sentido pela ativação e/ou síntese da LDH, foram investigados os comportamentos da PDC e ADH, duas enzimas que atuam em sequência em plantas tolerantes à deficiência de O₂, pela reciclagem do NAD⁺ e pela formação de um mínimo de energia na forma de ATP. Os resultados mostram que, em raízes de sesbania e de erva-de-bicho, foram detectados, de maneira geral, aumentos na atividade da PDC (Figura 8A e B) e da ADH (Figura 9A e B) em relação ao controle não alagado. Os géis de atividade da ADH em sesbania confirmam estes resultados (Figura 10). Por outro lado, em capim-gordura alagado, as atividades dessas duas enzimas, em praticamente todas as avaliações, foram menores que a do controle. Estes dados revelam que as duas primeiras espécies, ao garantirem um mínimo de energia,

aliadas ao estoque de carboidratos nas raízes (Figuras 4, 5 e 6), conseguem crescer (Figura 1) e sobreviver após o estresse (Figura 3).

Kato-Noguchi (2000), avaliando o efeito da anoxia em plântulas de alfaca, verificou que plântulas submetidas ao tratamento anóxico apresentaram maior atividade da ADH e PDC, quando comparadas ao seu controle. Da mesma forma, Kato-Noguchi & Morokuma (2007), trabalhando com arroz submetido à hipoxia, verificaram que as atividades da ADH e PDC aumentaram em coleótilos de quatro cultivares do arroz. A atividade da ADH e da PDC, em coleótilos anóxicos de algumas cultivares estudadas, chegou a ser 32 vezes e 24 vezes maior que a atividade observada em coleótilos não-estressados, respectivamente. A vantagem da indução da ADH sob anoxia foi relatada previamente como sendo responsável pela aceleração da fermentação alcoólica (Ricard et al., 1994; Drew, 1997), que foi suportado pelos estudos com mutantes ADH nulos de milho, *Arabidopsis* e arroz. Estes mutantes foram mais sensíveis à anoxia do que seus tipos selvagens (Matsumura et al., 1995). Liao & Lin (1995), trabalhando com *Momordica charantia*, verificaram que a atividade da ADH foi nove vezes maior que seu controle, quando submetida ao alagamento por três dias, fazendo com que houvesse um acúmulo de etanol nas raízes das plantas.

Logo após a transferência para um ambiente com baixa disponibilidade de O₂, as células limitam processos que são altamente energéticos e alteram o metabolismo de aeróbico para anaeróbico para geração de ATP. De acordo com alguns pesquisadores, as plantas somente conseguem sobreviver à anoxia caso consigam manter a produção de ATP e a reciclagem do poder redutor, fazendo associação dessa adaptação metabólica a aumentos na taxa de fermentação, em função de incrementos na atividade das enzimas ADH e LDH (Drew, 1997, Atkinson et al., 2008).

Menezes Neto et al. (1995), em estudo realizado com embriões de açaí, verificaram aumentos na atividade da ADH e LDH em resposta à anoxia, principalmente após 15 dias de estresse. Da mesma forma, Moraes et al. (2001), estudando alguns aspectos do crescimento e enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbico, observaram que, em *Brachiaria mutica*, houve um ajuste do metabolismo para as vias fermentativas, aumentando a atividade da ADH e da LDH, propiciando o sucesso dessa espécie durante o período em anoxia e sua sobrevivência pós hipoxia.

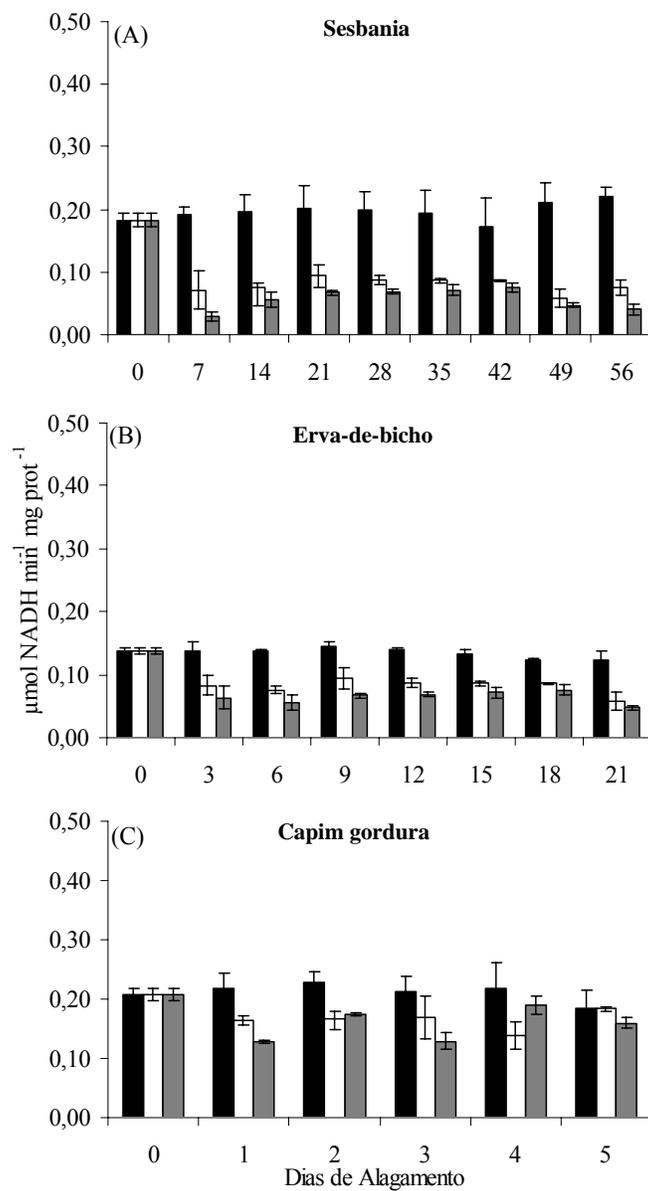


FIGURA 7 Atividade da Desidrogenase do lactato (LDH) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). Barras representam erro padrão da média de três repetições.

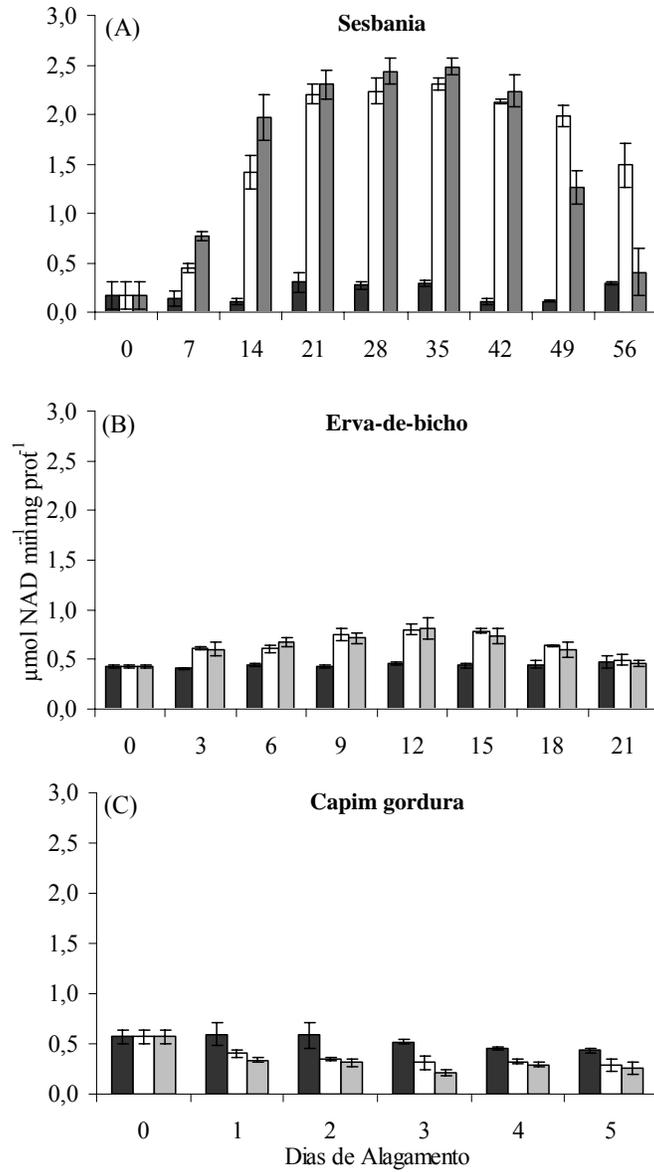


FIGURA 8 Atividade da Descarboxilase do piruvato (PDC) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). Barras representam erro de três repetições.

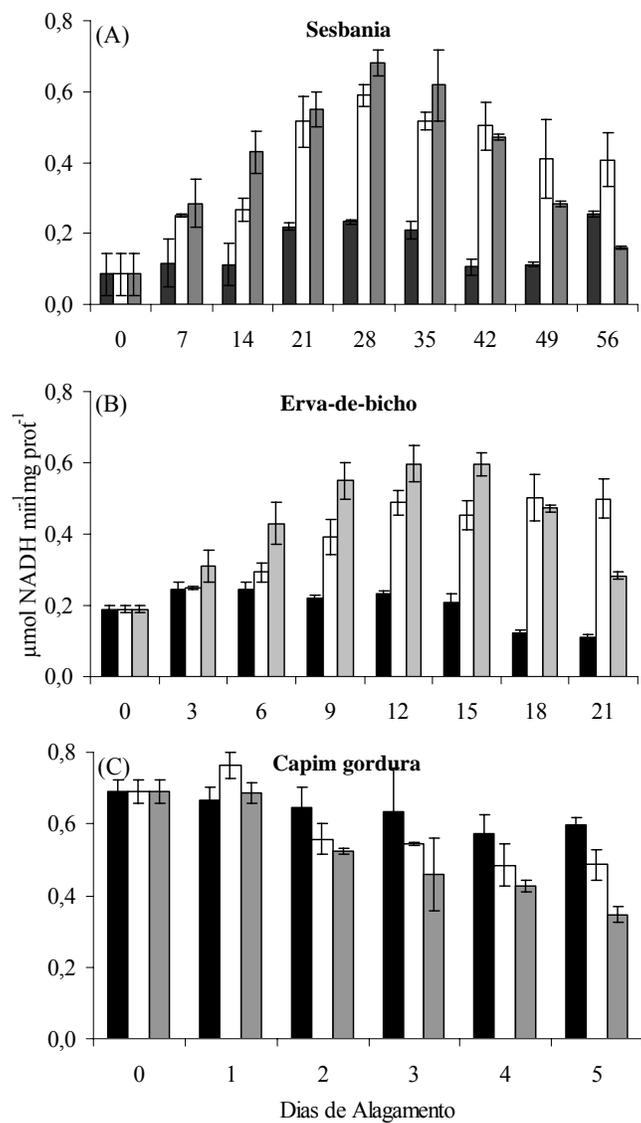


FIGURA 9 Atividade da Desidrogenase alcoólica (ADH) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). Barras representam erro padrão da média de três repetições.

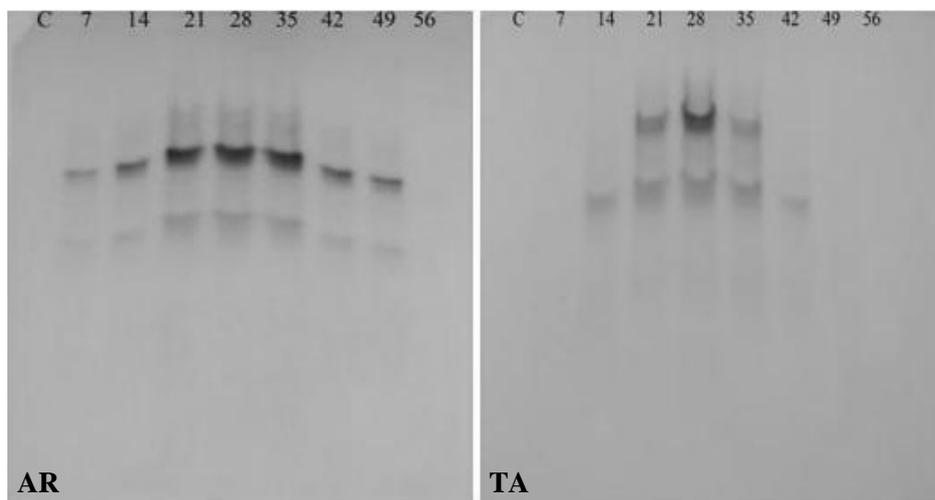


FIGURA 10 Gel de atividade da Desidrogenase alcoólica em raízes de sesbania alagadas nas raízes (AR) e totalmente alagadas (TA).

4.4 Adaptações morfoanatômicas

Um aspecto importante para a sobrevivência de uma espécie em ambiente sujeito a inundações refere-se às adaptações morfológicas internas e externas da planta à baixa disponibilidade de O₂ no substrato. Em caule de sesbania alagada somente nas raízes, por exemplo, observou-se a formação de rachaduras, além de hipertrofia e formação de uma região esponjosa na região submersa do coleto, associada com hipertrofia de lenticelas (Figura 12). Trabalhos envolvendo estresse de alagamento indicam que a hipertrofia do caule pode estar associada com o espaço intercelular, a quebra de células para formar aerênquima e a subsequente formação de raízes adventícias. A hipertrofia da base do caule tem sido uma resposta frequentemente observada em plantas sob alagamento (Pimenta et al. 1996) e, geralmente, está associada à formação de aerênquima.



FIGURA 11 Caule hipertrofiado de sesbania submetida ao alagamento do sistema radicular por 56 dias.

Os cortes anatômicos realizados na raiz principal de sesbania alagada não mostraram formação evidente de aerênquima (Figura 13 a e B), mas cortes transversais realizados em raízes adventícias mostraram grandes formações dessas estruturas (Figura 13C e D). Em raízes de erva-de-bicho alagadas (Figura 13F), evidenciou-se elevada ruptura das células do córtex, formando um aerênquima lisígeno, que serve como conduto para a transferência de O_2 para as raízes. Em capim-gordura alagado (Figura 13H), não foram encontrados aerênquimas, porém, observaram-se maior espessamento da endoderme e maior lignificação das fibras pericíclicas na região do cilindro vascular.

A formação de aerênquimas é vantajosa em plantas que se desenvolvem em ambientes com baixa disponibilidade de O_2 , por diminuir a resistência de difusão desse gás entre órgãos aerados e não aerados (Drew, 1997). Dessa forma, ainda que o ambiente externo esteja hipóxico, ou mesmo anóxico,

internamente, a raiz encontra-se aerada. Os resultados aqui encontrados seguem a mesma tendência encontrada em milho ‘Saracura’, no qual, sob condições de alagamento, ocorreu um desenvolvimento de aerênquimas lisígenos, tanto em raízes quanto em coleóptilo (Dantas et al., 2001). Santiago & Paoli (2007) observaram que, em *Genipa americana*, as raízes de plantas não alagadas apresentaram aerênquima distinto. No entanto, estas estruturas foram mais frequentes nas plantas submetidas ao alagamento, em que foi encontrado aerênquima lisígeno. Resultados semelhantes foram observados em plantas de *Polygonum punctatum* submetidas ao alagamento, nas quais houve formação de aerênquimas na região cortical das raízes, tendo o diâmetro dessas estruturas aumentado ao longo do período de avaliação (Deuner et al., 2007).

Considerando-se que a presença de aerênquimas confere às plantas uma maior adaptação à baixa disponibilidade de O₂, estes resultados mostram que a sesbania e a erva-de-bicho reagiram eficientemente a este estresse, fato que não ocorreu com o capim-gordura.

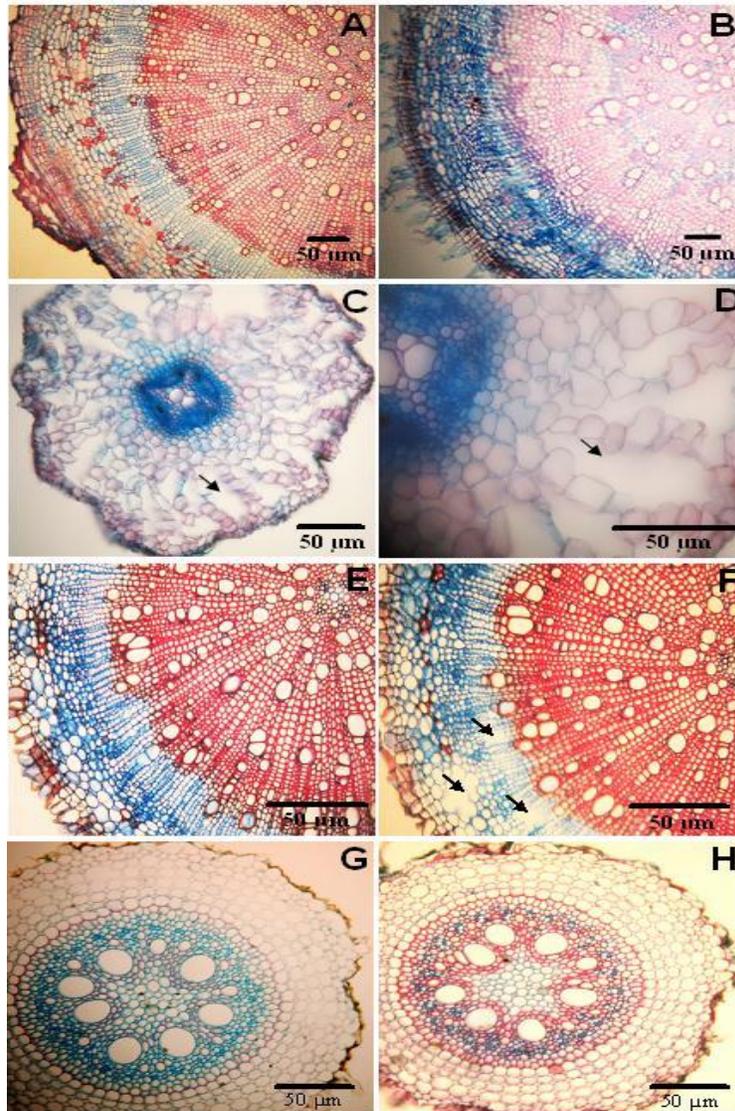


FIGURA 12 Fotomicrografia da secção transversal da raiz principal de sesbania não alagada (A), alagada por 56 dias (B) e da raiz adventícia de plantas alagadas nas raízes (C-D); raiz principal de erva-de-bicho não alagada (E), alagada por 21 dias (F); raiz principal de capim-gordura não alagada (G), alagada por 5 dias (H). As setas indicam a formação de aerênquimas.

4.5 Enzimas antioxidantes

Entre as várias enzimas envolvidas na eliminação das EROs, a SOD pode ser considerada uma enzima chave, sendo, geralmente, a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo (Willekens et al., 1995; Asada, 1999). A SOD realiza a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nesta pesquisa, verificou-se que, nos tratamentos alagados de sesbania, a atividade desta enzima diferenciou-se do controle do 21° ao 49° dia (Figura 13A). Erva-de-bicho, quando alagada, mostrou atividade superior à do controle entre o 3° e 15° dia, havendo uma queda brusca em sua atividade a partir desse período (Figura 13B). Em capim-gordura, de maneira geral, não se observou alteração expressiva na atividade da enzima, durante os cinco dias de avaliação (Figura 13C). Estes resultados mostram que as duas primeiras espécies, ao contrário do capim-gordura, acionaram, em um primeiro momento, efetivamente o sistema enzimático antioxidante, a fim de prevenir danos oxidativos.

Os géis de atividade radicular da SOD em sesbania alagada revelam a existência de sete isoformas e confirmam os resultados de atividade enzimática. É importante destacar que, no tratamento totalmente alagado, foi possível verificar a existência de uma isoforma ausente no tratamento alagado nas raízes (Figura 14). Quando se observa o gel de atividade da SOD em capim-gordura, podem-se identificar apenas três isoformas (Figura 15).

Embora a SOD faça parte do primeiro ajuste da tolerância das plantas ao estresse oxidativo, seu produto, o H_2O_2 , é também um radical livre tão prejudicial quanto o seu substrato. Dessa forma, um maior grau de proteção contra danos oxidativos deve requerer uma rápida eliminação do H_2O_2 pelas enzimas subsequentes do sistema antioxidante, como a CAT e a APX (Willekens et al., 1995; Asada, 1999). Nesse sentido, verificou-se que as atividades da CAT e da APX, em plantas alagadas de sesbania (Figuras 16A e 19A) e erva-de-bicho (Figuras 16B e 19B), foram maiores que as do controle até

o 49º (penúltimo dia) e o 21º dia de avaliação (último dia), respectivamente. Nas condições de déficit de O₂, os valores dos tratamentos alagados sempre foram maiores quando as plantas foram totalmente submersas. Já em capim-gordura, não se verificou um padrão de atividade entre os tratamentos alagados e controle (Figuras 16C e 19C), não se observando, de maneira geral, diferenças expressivas de atividade entre eles, exceto para a APX, em que, nas duas últimas avaliações, os valores das plantas controle foram maiores que os das alagadas. É importante destacar que os valores de atividade das duas enzimas para o capim-gordura foram muito menores que aqueles verificados para as outras duas espécies. Esses resultados foram confirmados por meio de gel de atividade para a CAT em plantas de sesbania (Figura 17) e capim-gordura (Figura 18).

A DHAR apresentou o mesmo padrão de atividade das enzimas anteriores, ou seja, sesbania e erva-de-bicho alagadas com atividades crescentes e com valores proporcionais ao nível de estresse (Figuras 20A e B) e capim-gordura com atividades semelhantes entre os tratamentos (Figura 20C).

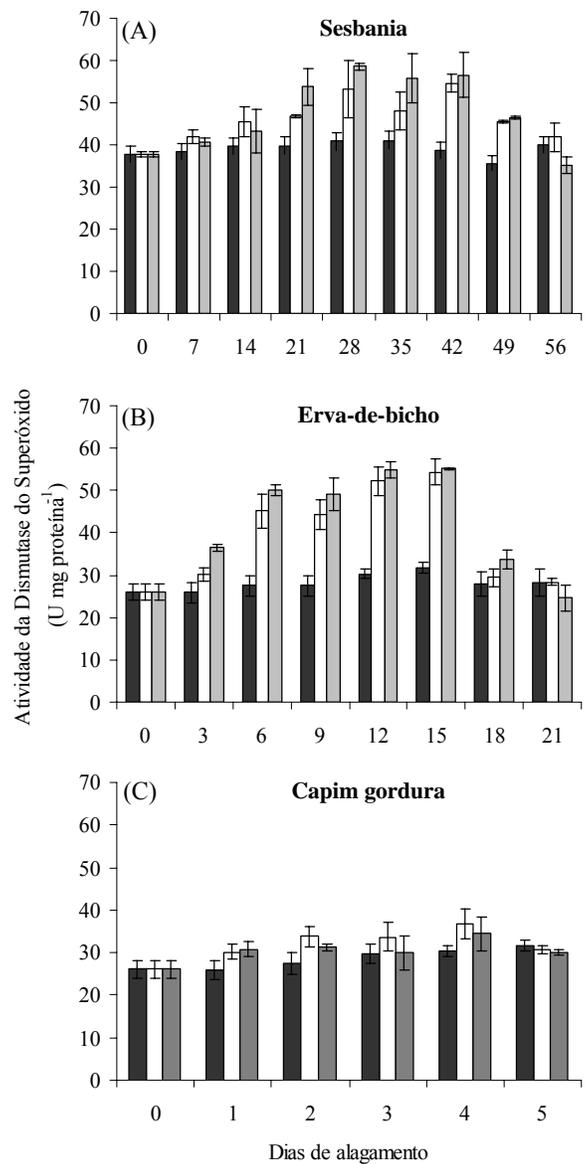


FIGURA 13 Atividade da Dismutase do superóxido (SOD) em plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▣). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

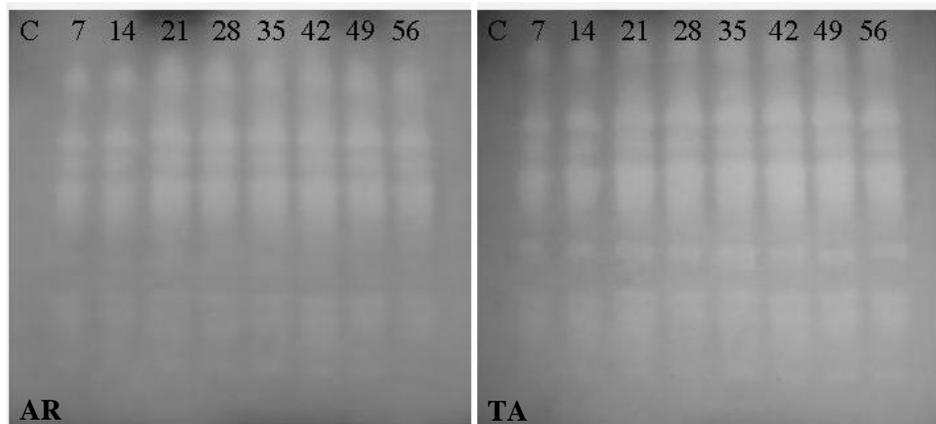


FIGURA 14 Gel de atividade da Dismutase do superóxido em raízes de sesbania alagadas nas raízes (AR) e totalmente alagadas (TA). C: Controle. Números referem-se aos dias de alagamento.

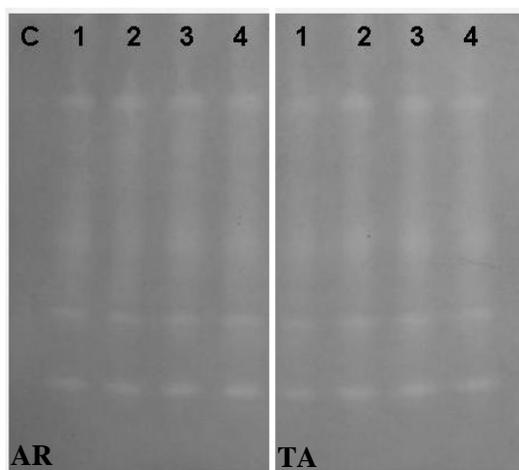


FIGURA 15 Gel de atividade da Dismutase do superóxido em raízes de capim-gordura alagada nas raízes (AR) e totalmente alagadas (TA). C: Controle. Números referem-se aos dias de alagamento.

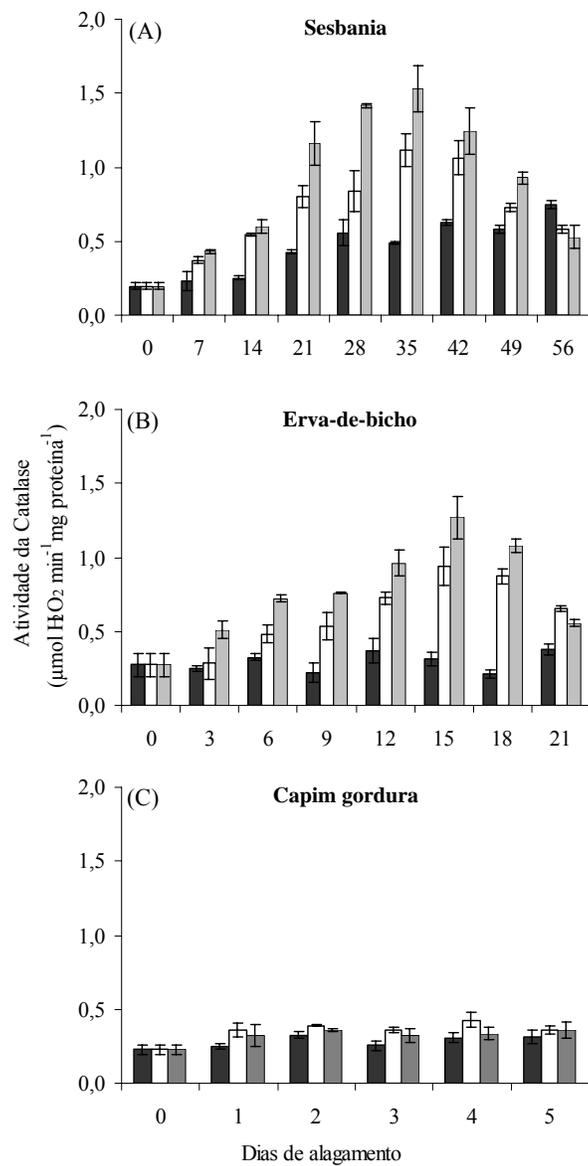


FIGURA 16 Atividade da Catalase (CAT) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

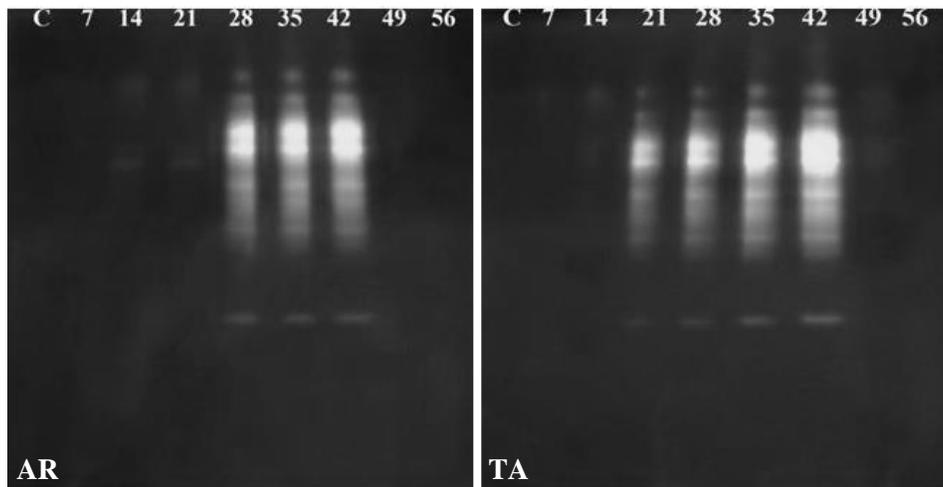


FIGURA 17 Gel de atividade da Catalase em raízes de sesbania alagadas nas raízes (AR) e totalmente alagadas (TA). C: controle. Os números referem-se aos dias de alagamento.

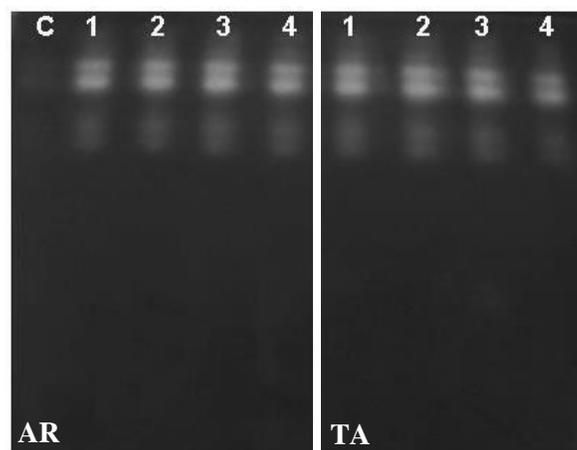


FIGURA 18 Gel de atividade da Catalase em raízes de capim-gordura alagada nas raízes (AR) e totalmente alagadas (TA). C: Controle. Os números referem-se aos dias de alagamento.

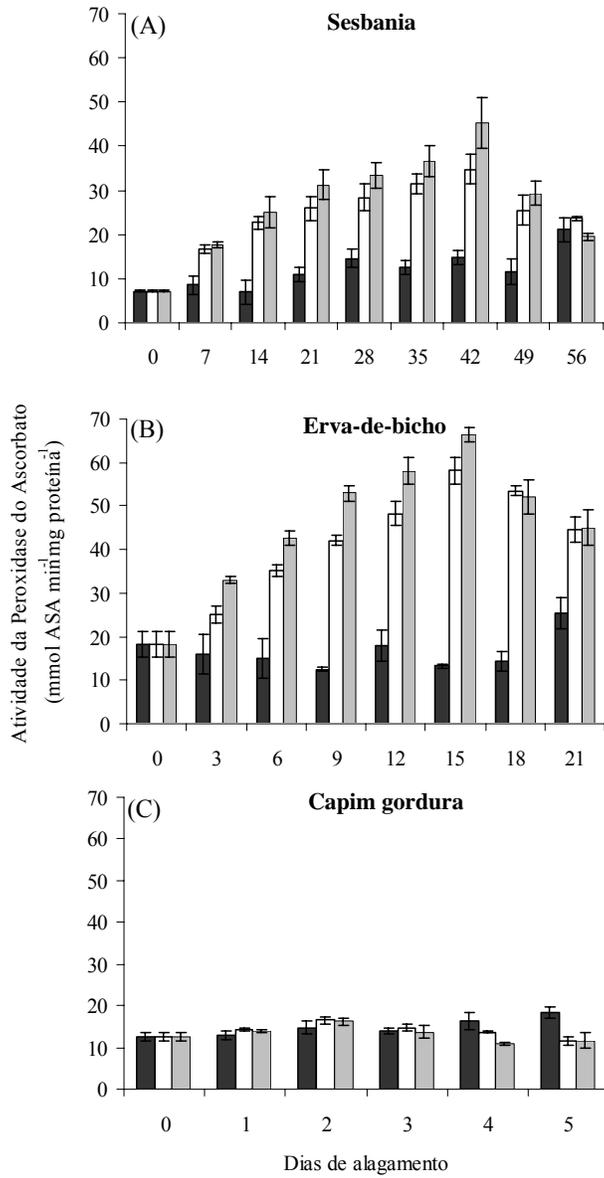


FIGURA 19 Atividade da Peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

A APX utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 à água, gerando monodehidroascorbato. Este, por sua vez, precisa ser regenerado novamente a ascorbato, a fim de manter o sistema antioxidante ativo. Para isso, outras reações enzimáticas estão envolvidas, intermediadas pela glutatona, a qual é oxidada (Biemelt et al., 1998). Dessa forma, a manutenção do *pool* de glutatona reduzida para o processo depende da atividade da GR. Nas plantas de sesbania e erva-de-bicho, observou-se, novamente, um comportamento semelhante da GR (Figura 21A e B), com as demais enzimas descritas. Por outro lado, a atividade da GR em capim-gordura, já a partir do primeiro dia de alagamento, apresentou valores menores que os do controle (Figura 21C).

O aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante verificado nas plantas parcial ou totalmente submersas de sesbania e erva-de-bicho mostra que o alagamento dessas plantas leva à produção de radicais livres ou espécies reativas de O_2 com a subsequente remoção pelo sistema de enzimas antioxidantes. Desse modo, o sistema antioxidante enzimático nestas duas espécies parece ser de fundamental importância para conferir tolerância ao alagamento. Este fato, aliado à capacidade de síntese e armazenamento de carboidratos e à operação eficiente de enzimas anaeróbicas, conferem, sem dúvida alguma, à sesbania e à erva-de-bicho, capacidade de suportar longos períodos de alagamento, tanto do sistema radicular como da planta toda.

De acordo com Zhang & Kirkham (1996), a capacidade de manutenção, em níveis elevados, da atividade da SOD, da CAT e da APX, sob condições de estresse ambiental, é essencial para a manutenção do equilíbrio entre a formação e a remoção do H_2O_2 do ambiente intracelular. Segundo Cakmak & Horst (1991), a redução na atividade da CAT e o aumento nas atividades das peroxidases indicam que, em plantas mantidas sob condições de estresse, o H_2O_2

gerado é mais consumido em processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo.

A ação dessas enzimas, além da atuação de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato, pode, efetivamente, eliminar e imobilizar as EROs (Scandalios, 1993).

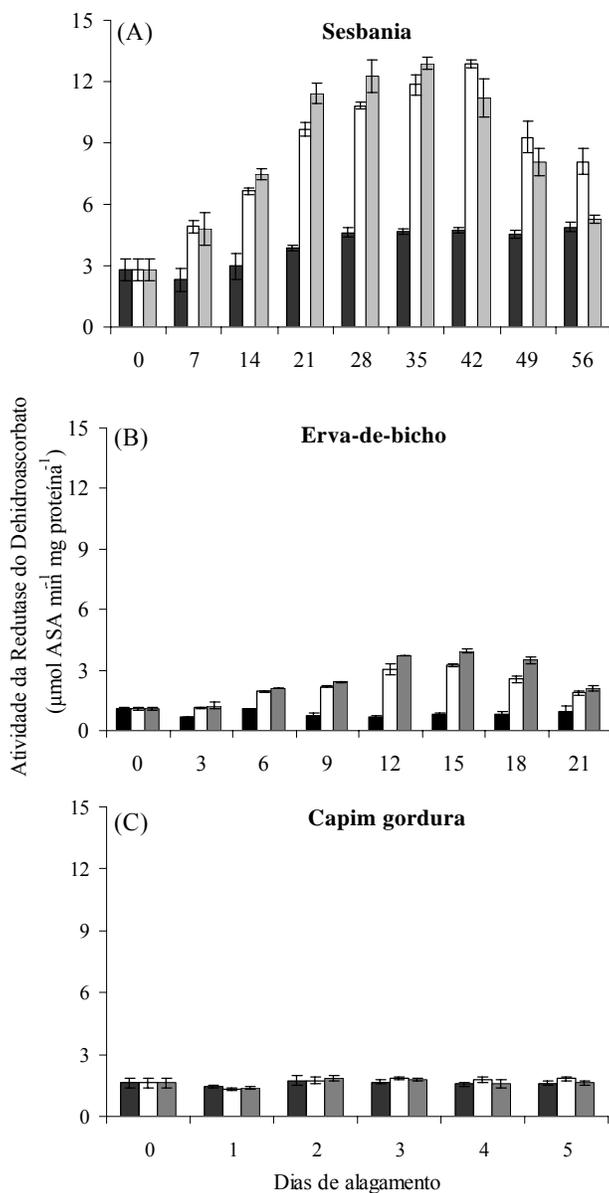


FIGURA 20 Atividade da Redutase do dehidroascorbato (DHAR) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▣). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

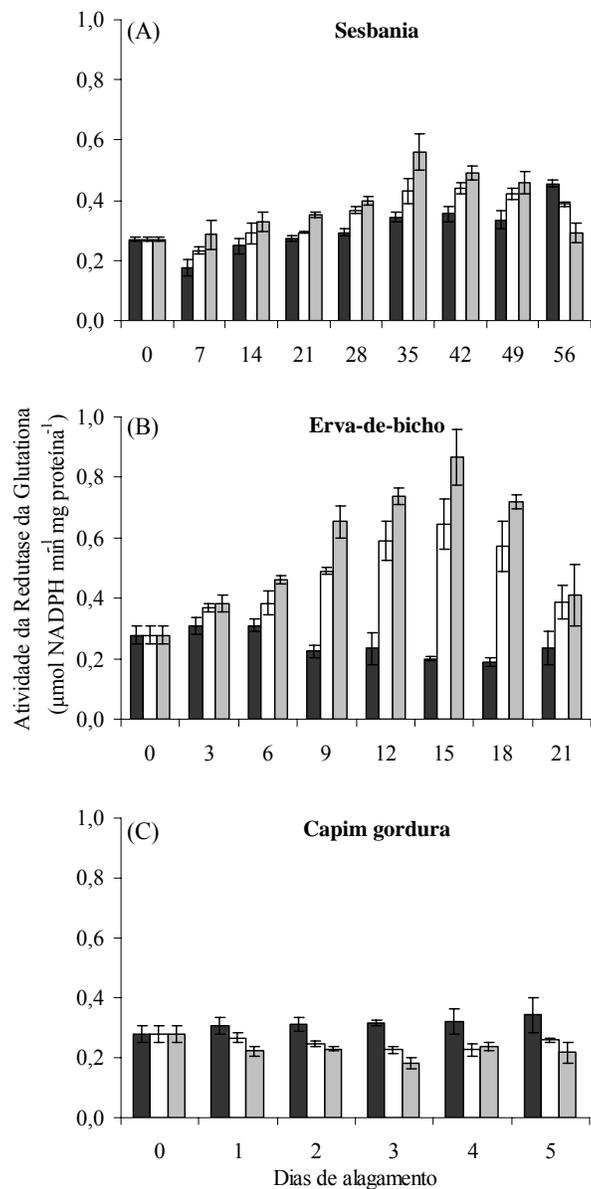


FIGURA 21 Atividade da Redutase da glutatona (GR) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▣). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

4.6 Avaliações bioquímicas diretamente envolvidas com o estresse oxidativo

Há muitos estudos mostrando que os efeitos do alagamento sobre as plantas podem ser mediados pela produção e acúmulo de espécies reativas de O_2 (Pastori & Foyer 2002; Boamfa et al., 2005), que podem causar extensivos danos às membranas e desencadear processos peroxidativos de lipídios (Alonso et al., 1997). Aumentos nas concentrações de MDA, como indicador de peroxidação de lipídios e de H_2O_2 , são indicativos de estresse oxidativo (Mittler, 2002).

No presente estudo, verifica-se que, de maneira geral, em plantas de sesbania e erva-de-bicho alagadas, a peroxidação de lipídios somente ocorreu próximo à metade do período experimental (Figura 22A e B). Ainda que a peroxidação de lipídios tenha iniciado neste período, verifica-se, entretanto, que, somente na última avaliação com a sesbania e na penúltima com a erva-de-bicho, as diferenças entre os tratamentos alagados e controle foram mais expressivas. Por outro lado, no capim-gordura, a peroxidação dos lipídios já ocorreu na primeira avaliação após submeter as plantas ao alagamento e foi evoluindo até o fim do experimento, com apenas cinco dias (Figura 22C). Os valores encontrados para a peroxidação de lipídios ao final do período experimental em capim-gordura só foram verificados para as outras duas espécies no quarto final de tempo. Estes resultados mostram, mais uma vez, a intolerância de capim-gordura e a tolerância de sesbania e de erva-de-bicho ao alagamento.

Em relação ao teor de H_2O_2 nas raízes das plantas estudadas, verifica-se que tanto a sesbania quanto a erva-de-bicho alagadas apresentaram aumento expressivo já na primeira avaliação aos sete e três dias, respectivamente (Figura 23A e B). Estes valores foram gradativamente caindo com a evolução do estresse e só voltaram a aumentar ao fim das avaliações, aos 56 dias para a sesbania e aos 21 dias, para erva-de-bicho. Os teores de H_2O_2 mostraram-se

permanentemente acima do controle, em todas as avaliações. Por outro lado, no capim-gordura alagado, os valores foram sempre superiores nas plantas sob estresse e aumentaram gradativamente até o final da pesquisa, aos cinco dias (Figura 23C). Esses resultados, somados à baixa atividade enzimática apresentada por essas plantas e ao aumento na peroxidação lipídica, provavelmente são os fatores responsáveis pela baixa tolerância dessas plantas à submersão.

Ao mesmo tempo, os resultados corroboram com a atividade de enzimas antioxidantes responsáveis pela quebra do H_2O_2 em água e O_2 , como a CAT (Figura 16) e a APX (Figura 19) para a sesbania e erva-de-bicho. A partir do 42º dia de alagamento para sesbania e 15º dia para a erva-de-bicho, a atividade dessas enzimas diminuiu, permitindo que o aumento na concentração de H_2O_2 (Figura 23) induzisse uma maior peroxidação de lipídios (Figura 22), fato que pode ter contribuído para a morte de algumas plantas de sesbania aos 56 dias.

Essas enzimas reduzem, de forma eficiente, as Eros, sob circunstâncias normais, mas, se a redução completa não ocorrer, como em condições de produção aumentada, o resultado pode ser um estado de estresse oxidativo, levando à oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA. Além disso, a oxidação e a inativação dos componentes celulares podem desencadear o processo de morte celular (Buckner et al., 2000).

Mittler (2002) sugeriu que altos níveis de H_2O_2 podem causar danos às membranas, pois ele pode acelerar a reação de Haber-Weis, resultando na formação do radical hidroxila e em peroxidação lipídica. Molassiotis et al. (2006), e Gunes et al. (2006), trabalhando com macieira e uva, respectivamente, observaram aumento de H_2O_2 e MDA em plantas submetidas a altas concentrações de boro nas raízes.

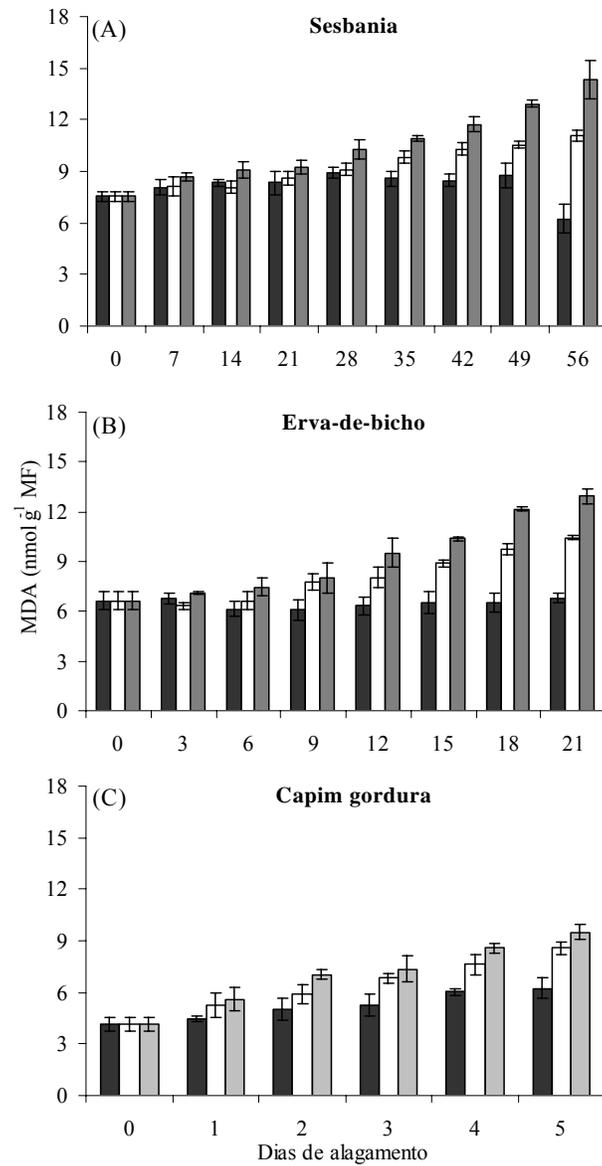


FIGURA 22 Peroxidação lipídica em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

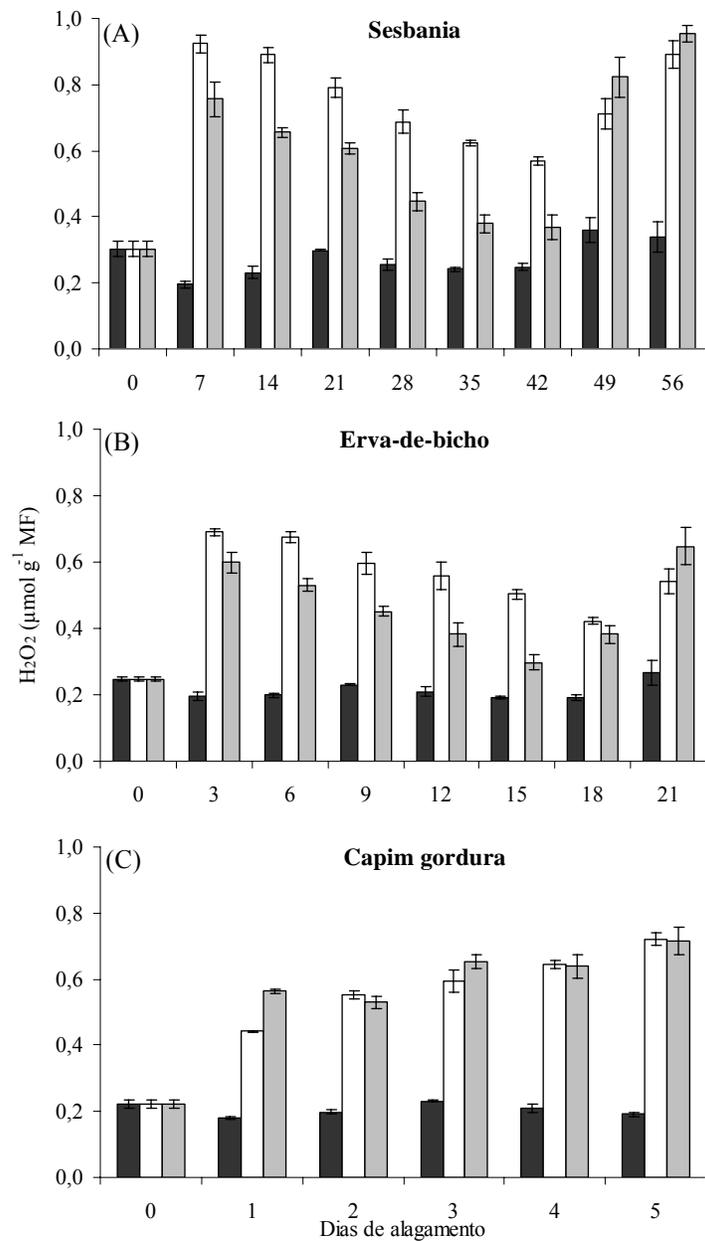


FIGURA 23 Peróxido de hidrogênio em raízes plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

Em estudo realizado com *Hordeum vulgare*, foi observado acúmulo de H_2O_2 sob hipoxia, tanto em raízes como em folhas (Kalashnikov et al., 1994). Da mesma maneira, a presença de H_2O_2 no apoplasto e em associação com a membrana plasmática foi visualizado por microscopia eletrônica de transmissão, em quatro espécies sob hipoxia (Blokhina et al., 2001).

A ativação de enzimas do sistema antioxidante interfere nos teores de alguns compostos que participam dessas reações. O ácido ascórbico, além de ser um antioxidante não enzimático, atua como coenzima da APX; portanto, seu conteúdo intercelular pode ser alterado em função de um estresse. O mesmo pode ocorrer com o dehidroascorbato, uma vez que ele é o produto da reação dessa mesma enzima (Asada, 1999).

Neste trabalho, observou-se que plantas de sesbania e erva-de-bicho alagadas apresentaram diferenças expressivas no teor de ascorbato (Figura 24A e C) e de dehidroascorbato (DHA) (Figura 24B e D) já na primeira avaliação, permanecendo elevados até o final do experimento. No capim-gordura, os valores destes dois antioxidantes foram semelhantes em todos os tratamentos e permaneceram baixos em todas as avaliações (Figura 24E e F). Na média, dentro dos tratamentos alagados, o teor de ascorbato foi, aproximadamente, 5 e 2,5 vezes maior em sesbania e em erva-de-bicho em relação ao capim-gordura, respectivamente. Para o DHA, estes valores foram, na mesma ordem, aproximadamente 3,5 e 2 vezes maiores.

Visto que o ascorbato serve como um excelente antioxidante e desempenha papel fundamental na remoção do H_2O_2 por meio do ciclo ascorbato/glutationa, o aumento na sua concentração nas plantas de sesbania e erva-de-bicho mostra sua importância contra o estresse oxidativo provocado pelo alagamento.

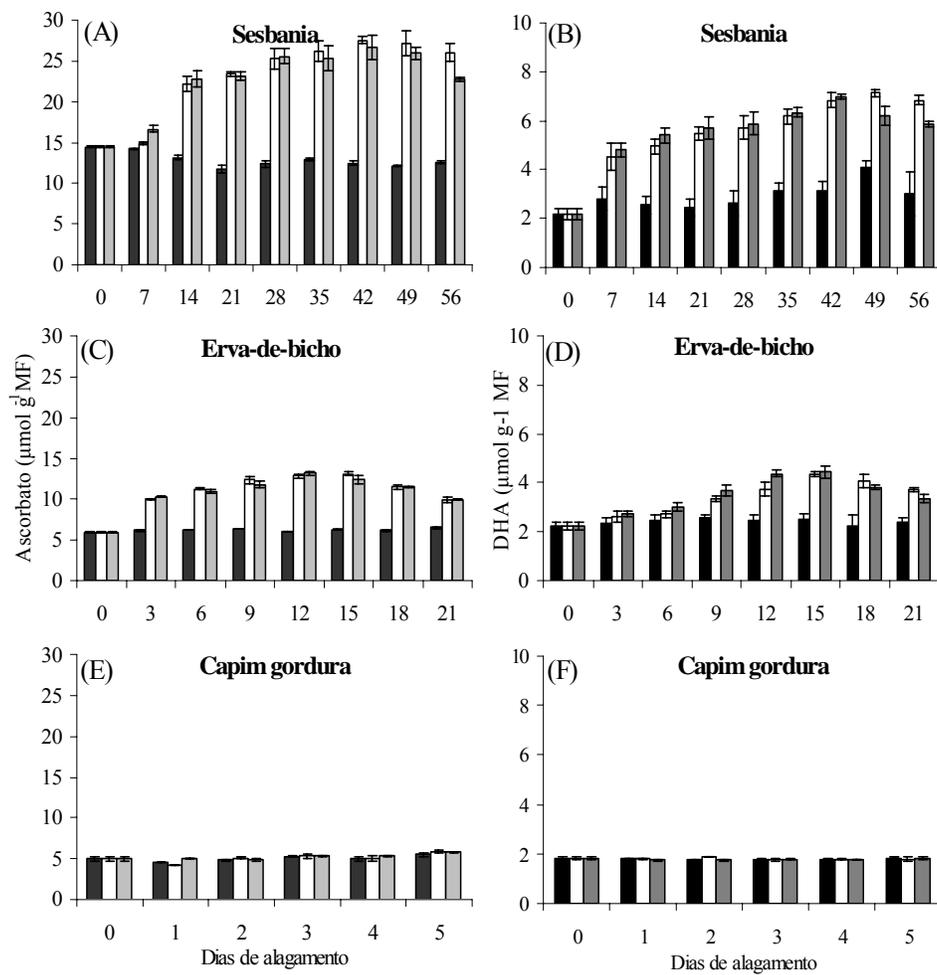


FIGURA 24 Ascorbato e dehidroascorbato (DHA) em raízes de plantas submetidas ao alagamento. Controle (■), plantas alagadas nas raízes (□) e totalmente alagadas (▒). As barras representam o erro padrão da média de três repetições.

5 CONCLUSÕES

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar o efeito do alagamento de *Sesbania virgata* (sesbania), *Polygonum acuminatum* (erva-de-bicho) e *Melinis minutiflora* (capim-gordura), investigando o crescimento, a anatomia, o metabolismo anaeróbico e o sistema de defesa antioxidante das plantas em diferentes períodos de estresse. Os resultados permitiram concluir que sesbania e erva-de-bicho são tolerantes ao alagamento, suportando períodos de 56 e 21 dias, respectivamente. As causas desta tolerância são: fotossíntese ativa durante o período de estresse; acúmulo e utilização de carboidratos nas folhas e raízes e a manutenção do crescimento vegetativo; ativação do metabolismo anaeróbico, principalmente nos passos catalisados pelas enzimas descaboxilase do piruvato e desidrogenase alcoólica; ativação do sistema antioxidante e formação de estruturas morfológicas, tais como aerênquimas e raízes adventícias. Por outro lado, o capim-gordura mostrou-se intolerante ao alagamento, apresentando sensibilidade ao estresse a partir das primeiras 24 horas, não suportando períodos superiores a cinco dias. Todas as características de tolerância mostradas pela sesbania e erva-de-bicho foram ausentes nesta espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C. **Eletoforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 2004. 627 p.
- ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta : BBA. Biomenbranes**, v. 1323, n. 1, p.75-84, Jan. 1997.
- ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; VITORINO, P. G. Mecanismo de tolerância de plantas ao alagamento. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 221-242, mar. 2000.
- ANDRADE, R.V. Épocas de colheita, produção e qualidade de sementes de capim gordura. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 5, n. 2, p. 9-22, jan./abr. 1983.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, June 2004.
- ARAKAWA, N.; TSUTSUMI, K.; SANCEDA, N. G.; KURATA, T.; INAGAKI, C. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tóquio, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.
- ASADA, K. **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. Nova York: Cold Spring Harbor Lab., 1997. 715 p.
- ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts : scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, June 1999.
- ATKINSON, C. J.; HARRISON-MURRAY, R. S.; TAYLOR, J. M. Rapid flood-induced stomatal closure accompanies xylem sap transportation of root-derived acetaldehyde and ethanol in *Forsythia*. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 64, n. 3, p. 196-205, Apr. 2008.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress : acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto v. 59, p. 313–339, June 2008.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BLOKHINA, O. B.; CHIRKOVA, T. V.; FAGERSTED, K. V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 359, p. 1179-1190, June 2001.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 179-194, Jan. 2003.

BLOOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J.; SMAN, A. J. M. van der. Responses to total submergence in tolerant and intolerant riverside species. In: JACKSON, M. B.; BLACK, C. R. **Interacting stresses on plants in a changing climatic**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 243-266.

BOAMFA, E. I.; ERES, A. H.; RAM, P. C.; JACKSON, M. B.; REUSS, J.; HARREN, J. M. Kinetics of ethanol and acetaldehyde release suggest a role for acetaldehyde production in tolerance of rice seedlings to micro-aerobic conditions. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 727-736, Sept. 2005.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, June 1992.

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

BRAILSFORD, R.W.; VOESENEK, L. A.C. J.; BLOOM, C. W. P. M.; SMITH, A. R.; HALL, M. A.; JACKSON, M. B. Enhanced ethylene production by primary roots of *Zea mays* L. in response to sub-ambient partial pressures of oxygen. **Plant Cell Environmental**, Logan, v. 16, n. 9, p. 1071-1080, Dec. 1993.

BUCKNER, B.; JOHAL, G. S.; JANICK-BUCKNER, D. Cell death in maize. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 108, n. 3, p. 231-239, Mar. 2000.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 52, p.302-310, 1978.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of Al on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glicine max* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, Nov. 1991.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 127-132, Jan. 1993.

COSTA, A. M.; GOBBI, E. L.; DEMUNER, V. G.; HEBLING, S. A. O efeito da inundação do solo sobre o crescimento inicial de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake, guapuruvu. **Natureza on line**, Santa Teresa, ES, v. 4, n.1 p. 7-13, 2006. Disponível em: <
http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/Schizolobium_alagamento.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2009.

CUTTER, E. G. **Plant anatomy**. London: W. Clowes, 1978. 315 p.

DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2001.

DAVIDSON, J. L.; MILTHORPE, F. L. The effect of defoliation on the carbon balance in *Dactylis glomerata*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 185-198, Apr. 1966.

DEUNER, S.; NOGUEIRA, R. C.; ZANANDREA, I.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D.; MELO, E. F. Respostas anatômicas de plantas de erva-de-bicho (*Polygonum punctatum* Elliot) submetidas ao alagamento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 5, n. S1, p. 120-122, 2007.

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

DIXON, M. H.; HILL, S. A.; JACKSON, M. B.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J. Physiological and metabolic adaptations of potamogeton pectinatus L. tubers support rapid elongation of stem tissue in the absence of oxygen. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 1, p. 128-140, Jan. 2006.

DONAGHY, D. J.; FULKERSON, W. J. Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*. **Grass and Forage Science**, Cirencester, v. 53, n. 3, p. 211-218, Sept. 1998.

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

ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D. D. **Biochemistry of plants**. Londres: Academic, 1987. v. 11, p. 253-315.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia : is survival a balancing act? **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, n. 9, p. 449-456, Sept. 2004.

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

GOMIDE, C. A. M.; GOMIDE, J. A.; HUAMAN, C. A. M.; PACIULLO, D. S. C. Fotossíntese, reservas orgânicas e rebrota do Capim-Mombaça (*Panicum maximum* Jacq.) sob diferentes intensidades de desfolha do perfilho principal, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2165-2175, nov./dez. 2002.

GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p.445-451, Feb. 2008.

GUNES, A.; SOYLEMEZOGLU, G.; INAL, A.; BAGCI, E.G.; COBAN, S.; SAHIN, O. Antioxidant and stomatal responses of grapevine *Vitis vinifera* L.) to boron toxicity. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 3, p. 279-284, Nov. 2006.

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

HE, J. B.; BÖGEMANN, G. M.; STEEG, H. M. van de; RIJNDERS, J. G. H. M.; VOESENEK, L. A. C. J; BLOM, C. W. P. M. Survival tactics of *Ranunculus* species in river floodplains. **Oecologia**, New York, v. 118, n. 1, p. 1-8, Jan. 1999.

INSAUSTI, P.; GRIMOLDI, A. A.; CHANETON, E. J.; VASELLATI,

V. Flooding induces a suite of adaptive plastic responses in the grass *Paspalum dilatatum*. **New Phytologist**, Sheffield, v.152, n. 2, p. 291-299, Nov. 2001.

JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J. A.; PASTORI, G.; RIO, L. A. del; SEVILLA, F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 118, n. 4, p. 1327-1335, Dec. 1998.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523 p.

KALASHNIKOV, J. U. E.; BALAKHNINA, T. I.; ZAKRZHEVSKY, D. A. Effect of soil hypoxia on activation of oxygen and the system of protection from oxidative destruction in roots and leaves of *Hordeum vulgare*. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscou, v. 41, n. 5, p. 583-588, Sept.1994.

KATO-NOGUCHI, H. Evaluation of the importance of lactate for the activation of ethanolic fermentation in lettuce roots in anoxia, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 1, p. 28-33, May 2000.

KATO-NOGUCHI, H.; MOROKUMA, M. Ethanolic fermentation and anoxia tolerance in four rice cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 2, p. 168-173, Feb. 2007.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, dez. 1998.

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

KUMUTHA, D.; SAIRAM, R. K.; EZHILMATHI, K.; CHINNUSAMY, V.; MEENA, R. C. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) : upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Science**, v. 175, n. 5, p. 706-716, Nov. 2008.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Effect of flood stress on morphology and anaerobic metabolism of *Momordia charantia*. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 35, n. 1, p. 105-113, Jan. 1995.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceeding National Science Council**, Taipei, v. 25, n. 3, p. 148-157, July 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil** : terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 435 p.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species : response of alga cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, Feb. 2000.

MARTINS, C. R.; LEITE, L. L.; HARIDASAN, M. Capim gordura (*Melinis minutiflora* P. Beauv.), uma gramínea exótica que compromete a recuperação de áreas degradadas em unidades de conservação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 739-747, set./out. 2004.

MATSUMURA, H.; TAKANO, T.; YOSHIDA, K. T.; TAKEDA, G. A rice mutant lacking alcohol dehydrogenase. **Breed Science**, v. 45, n. 3, p. 365-367, 1995.

MENEZES NETO, M. A.; ALVES, J. D.; OLIVEIRA, L. E. M. Anaerobic metabolism of *Eutерpe oleracea* : II. plant tolerance mechanism to anoxia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.7, n.1, p. 47-51, July 1995.

MIELKE, M. S.; MATOS, E. M.; COUTO, V. B.; ALMEIDA, A. A. F.; GOMES, F. P.; MANGABEIRA, P. A. O. Some photosynthetic and growth responses of *Annona glabra* L. seedlings to soil flooding. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 905-911, Out./Dec. 2005.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MOLASSIOTIS, A.; SOTIROPOULOS, T.; TANOU, G.; DIAMANTIDIS, G.; THERIOS, I. Boron induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EMO (*Malus domestica* Borkh). **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 56, n. 1, p. 54-62, May 2006.

- MORAES, M. G.; ALVES, J. D.; OLIVEIRA, L. E. M. Efeito da anaerobiose induzida por alagamento em plântulas de seis espécies herbáceas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 941-951, 2001.
- MUSTROPH, A.; ALBRECHT, G. Fermentation metabolism in roots of wheat seedlings after hypoxic pre-treatment in different anoxic incubation systems. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, n. 5, p. 394-407, Apr. 2007.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n.5, p. 867-880, Aug. 1981.
- NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J. MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 165-176, Feb. 2008.
- OLIVEIRA, L. E. M.; VASCONCELOS, R. V.; ALVES, R. T.; NETO, E. G. G.; ALVES, J. D. Revegetação de áreas de depleção reservatórios hidrelétricos. In: SIMPÓSIO DE MATA CILIAR: CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 1., 1999, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE/CEMIG, 1999. p. 136-171.
- PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 2, p. 460-468, June 2002.
- PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho ‘Saracura’ em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p.1649-1656, dez. 2008.
- PIMENTA, J. A.; MEDRI, M. E. BIANCHINI, E.; MULLER, C.; OKAMOTO, J. M.; FRANCISCONI, L. M. J.; CORREA, G.T. Aspectos da morfoanatomia e fisiologia de *jacarandu puberula* Chan. (Bignoniaceae) em condições de hipoxia. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 215-220, jan./mar. 1996.
- POLLE, A.; RENNENBERG, H. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: MANSFIELD, T.; FOWDEN, L.; STODDARD, F. **Plant adaptation to environmental stress**. Londres: Chapman & Hall, 1993. p. 263-273.

POTT, A.; POTT, V. **Plantas do pantanal**. Brasília: EMBRAPA-SPL, 1994. 320 p.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28 n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

RICARD, B.; COUE, E. I.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P. H.; SAINT-GES, V.; PRADET, A. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, n. 1, p.1-10, Jan. 1994.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Techniques in free radical research**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. v. 22, 291 p.

RIVOAL, J.; RICARD, B.; PRADET, A. Lactate dehydrogenase in *Oryza sativa* L. seedlings and roots. Identification and partial characterization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 3, p. 682-686, Mar. 1991.

ROBERTS, H. A. Seed banks in soils. **Advances in Applied Biology**, v. 6, n. 1, p.1-55, 1981.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4. ed. Belmont: Wadsworth, 1992. 682 p.

SANTIAGO, E. F.; PAOLI, A. A. S. Respostas morfológicas em *Guibourtia hymenifolia* (Moric.) J. Leonard (Fabaceae) e *Genipa americana* L. (Rubiaceae), submetidas ao estresse por deficiência nutricional e alagamento do substrato. **Revista Brasileira Botânica**, v. 30, n. 1, p. 129-138, 2007.

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

SHI, F.; YAMAMOTO, R.; SHIMAMURA, S.; HIRAGA, S.; NAKAYAMA, N.; NAKAMURA, T.; YUKAWA, K.; HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H.; KOMATSU, S. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1295-1303, Apr. 2008.

SHIBA, H.; DAIMON, H. Histological observation of secondary aerenchyma formed immediately after flooding in *Sesbania cannabina* and *S. rostrata*, **Plant and Soil**, Crawley, v. 255, n. 1, p. 209-215, Aug. 2003.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n.372, p. 1305-1319, May 2002.

SINGH, H. P. Submergence tolerance of rainfed lowland rice : search for physiological marker traits. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 158, n. 3, p. 83-889, 2001.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, London, v. 125, n. 1, p. 27-58, Sept. 1993.

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

THOMAS, A.L. **Modificações morfológicas e assimilação de nitrogênio em plantas de soja (*Glycine max*) com sistemas radiculares sob deficiência de O₂**. 2004. 87 p.Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants : protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VOESENEK, L. A. C. J.; COLMER, T. D.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F. F.; PEETERS, A. J. M. How plants cope with complete submergence. **New Phytologist**, Sheffield, v. 170, n. 2, p. 213-226, Apr. 2006.

WADT, G. S. **Práticas de conservação do solo e recuperação de áreas degradadas**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2003. 29 p.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; MONTAGU, M.van; CAMP, W. van. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v. 1, n. 3, p. 207-228, Sept. 1995.

YAMANOSHITA, T.; MASUMORI, M.; YAGI, H.; KOJIMA, K. Effects of flooding on downstream processes of glycolysis and fermentation in roots of *Melaleuca cajuputi* seedlings. **Journal of Forest Research**, v. 10, p. 199-204, 2005.