

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica da
Corticeira-do-banhado em condições de alagamento**

Cristina Ferreira Larré

Pelotas, 2011

Cristina Ferreira Larré

**Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica da
Corticeira-do-banhado em condições de alagamento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Peters

Co-orientadores: Prof. Dr. Dario Munt de Moraes

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

L333c Larré, Cristina Ferreira

Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica da Corticeira-do-banhado em condições de alagamento / Cristina Ferreira Larré ; orientador José Antônio Peters ; co-orientadores Dario Munt de Moraes e Valmor João Bianchi - Pelotas, 2011.-73f. : il.- Tese (Doutorado). – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Hipoxia 2.Estresse oxidativo 3.Fermentação
I.Peters, José Antônio(orientador) II. Título.

CDD 634.9

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Antônio Peters

Prof^a. Dra. Ilisandra Zanandrea

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Dr. Sidnei Deuner

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela família e por sempre me iluminar em todos os momentos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

Ao Departamento de Botânica, desta universidade, pela liberação concedida e apoio para a realização do curso de doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela atenção, carinho, respeito e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao meu orientador, professor José Antônio Peters, pela orientação, paciência, respeito, confiança, amizade e agradável convívio ao longo do curso.

Aos professores e co-orientadores, Dario Munt de Moraes e Valmor João Bianchi, pelos ensinamentos, pela amizade e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano do Amarante, pelo auxílio na elaboração do trabalho e, principalmente, pela paciência, incentivo, carinho e inestimável amizade.

Ao amigo Sidnei Deuner e ao professor Marcos Antônio Baccarin, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família pelo apoio, suporte e incentivo durante meu trabalho.

Às minhas filhas, Thaís e Júlia, e ao meu esposo Valter por entenderem minhas ausências, pela paciência diária e pelo amor incondicional, que me deram força e suporte para seguir em frente.

A todos os colegas do Departamento de Botânica, pelo incentivo e amizade, em especial aos colegas Rudinei Teixeira e Sérgio Nolasco da Luz pela ajuda indispensável na realização deste trabalho e pela agradável convivência.

Às amigas e colegas Caroline Moraes, Rita Moraes, Patrícia Marini e Milene Galho, pela amizade sincera, pela ajuda oferecida durante todo o trabalho, mas acima de tudo pela confiança, por acreditarem sempre em mim,

pelo carinho e apoio que serviram de estímulo, e pelos agradáveis e divertidos momentos que passamos juntas.

Aos colegas Emanuela Martinazzo e Junior Borella pela convivência, sugestões e imprescindível ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos, pelo carinho e amizade com que me receberam em especial ao Rodrigo Danielowski, pela prestimosa ajuda.

Aos demais colegas do curso pela amizade, carinho e respeito e pelos ótimos momentos.

RESUMO

LARRÉ, Cristina Ferreira. **Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica da Corticeira-do-banhado em condições de alagamento**. 2011. 73f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A *Erythrina crista-galli* L., popularmente conhecida como Corticeira-do-banhado, é uma árvore de porte médio, pertencente a família fabaceae, conhecida, especialmente, pela coloração vibrante de suas flores. A corticeira está listada como planta imune ao corte, pelo CONAMA, tamanha é a devastação do seu habitat natural e devido a sua importância na restauração de mata ciliar e recuperação de ecossistemas degradados em locais com inundação periódica e de rápida duração. Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar as alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em plantas de corticeira-do-banhado em resposta ao estresse ocasionado pela diferença nas condições hídricas. Plantas oriundas de sementes foram cultivadas em vasos de 0,5L em casa de vegetação e transferidas para vasos de cinco litros. Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas na raiz com a manutenção de uma lâmina de água acima do solo e plantas não alagadas (controle), mantidas em capacidade de campo. Foram avaliados os parâmetros de crescimento, alterações no aparato fotossintético através da análise da fluorescência transiente da clorofila *a* e a atividade das enzimas do estresse oxidativo, quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas e raízes além da atividade das enzimas fermentativas em raízes. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Os resultados obtidos permitem afirmar que o alagamento, durante o período estudado, não compromete a sobrevivência das plantas de Corticeira-do-banhado, pois estas continuaram a se desenvolver mesmo sob alagamento, apesar de apresentarem crescimento significativamente menor em relação às plantas não alagadas. As plantas também são capazes de acionar o sistema de defesa antioxidante enzimático, reduzindo assim os danos oxidativos. Da mesma

forma, a espécie é hábil em utilizar a rota fermentativa como alternativa para a manutenção da produção de energia durante a condição hipóxica. A formação das raízes adventícias é a estratégia morfológica mais evidente para a sobrevivência das plantas sob alagamento, permitindo que através das mesmas ocorra um ajustamento metabólico lento e contínuo, durante todo o período de estresse.

Palavras-chave: Hipoxia. Estresse oxidativo. Fermentação

ABSTRACT

LARRÉ, Cristina Ferreira. **Morphological, physiological and biochemical characterization of Corticeira-do-banhado in flooding conditions.** 2011. 73f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The *Erythrina crista-galli* L., popularly known as corticeira-do-banhado, is a medium sized tree belonging to family Fabaceae, known especially for their vibrant colored flowers. The cork is listed as a plant immune to the court, by CONAMA, such is the devastation of their habitat and due to its importance in the restoration of riparian vegetation and restoration of degraded ecosystems in areas with periodic flooding in a short duration. Therefore, the objective was to study the morphological, physiological and biochemical alterations in corticeira-do-banhado in response to stress caused by the difference in water conditions. Plants derived from seeds were grown in 0.5 liter pots in a greenhouse and transferred to five liters pots. We used two treatments: root plants flooded with maintaining a water level above the ground and plants are not flooded (control), maintained at field capacity. We evaluated growth parameters, changes in photosynthetic apparatus by analyzing the fluorescence of chlorophyll a and transient activity of enzymes of oxidative stress, lipid peroxidation and quantification of hydrogen peroxide in leaves and roots but the activity of fermentative enzymes in roots. The experimental design was randomized blocks and the results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and analyzed by comparison of means by Tukey test at 5% significance. The results revealed that the flooding during the period studied, does not compromise the plants Corticeira-do-banhado, because they continued to develop even under flooding, although with significantly lower growth compared to plants not flooded. Plants are also able to trigger the enzymatic antioxidant defense system, thereby reducing oxidative damage. Likewise, the species is able to use the route as an alternative fermentation to maintain energy production during the hypoxic condition. The formation of adventitious roots is the most obvious morphological strategy for the survival of plants under flooding, allowing them to occur through a metabolic slow and continuous adjustment throughout the period of stress.

Keywords: Hypoxia. Oxidative stress. Fermentation.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH = álcool desidrogenase

APP = área de preservação permanente

ATP = adenosina trifosfato

ASA = ascorbato

APX = ascorbato peroxidase

ATP = adenosina trifosfato

BSA = soro bovino albumina

CAT = catalase

DTT = ditioneitol

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs = espécies reativas de oxigênio

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

KCN = cianeto de potássio

LDH = lactato desidrogenase

MDA = malonaldeído

NAD⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT = azul de nitro tetrazólio

O₂ = oxigênio molecular

O₂^{•-} = radical superóxido

¹O₂ = oxigênio singlet

OH[•] = radical hidroxila

FSII = fotossistema II

PDC = piruvato descarboxilase

PVPP = polivinilpolipirrolidona

SOD = superóxido dismutase

TBA = ácido tiobarbitúrico

TCA = ácido tricloroacético

TPP = tiamina pirofosfato

TRE = taxa de transporte de elétrons

ΦPSII = rendimento quântico efetivo do FSII

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Formação de rachaduras caulinares (RC), raízes adventícias (RA) e lenticelas hipertróficas (In) em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento durante 40 dias 25

FIGURA 2: Altura da parte aérea (A), Número de folhas (B), Área foliar (C) e Massa seca das folhas (D), Comprimento da raiz (E), Massa seca da raiz (F), Massa seca do caule (G) e Diâmetro do caule (H) de plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento (■) e não alagadas (□) durante quatro períodos de avaliação.....28

FIGURA 3: Parâmetros fotossintéticos deduzidos de análise por Teste-JIP da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento durante quatro períodos (10, 20, 30 e 40 dias)..... 31

FIGURA 4: Índice de clorofila em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento (■) e não alagadas (□) durante quatro períodos de avaliação (10, 20, 30 e 40 dias)..... 32

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Atividade das enzimas CAT (A) APX (B) e SOD (C) em folhas de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□)..... 47

FIGURA 2: Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) em folhas de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□)..... 48

FIGURA 3: Atividade das enzimas CAT (A) APX (B) e SOD (C) em raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□)..... 50

FIGURA 4: Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) em raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□)..... 51

FIGURA 5: Atividade das enzimas SOD (A) CAT (B) e APX (C) nas raízes principais-E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento..... 53

FIGURA 6: Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) nas raízes principais - E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento..... 54

FIGURA 7: Atividade das enzimas LDH (A) PDC (B) e ADH (C) em raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e em plantas controle-C (□)..... 56

FIGURA 8: Atividade das enzimas LDH (A) PDC (B) e ADH (C) nas raízes principais-E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento..... 57

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1	20
CRESCIMENTO E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> EM PLANTAS DE <i>Erythrina crista-galli</i> L. SOB CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO 2	38
ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES E FERMENTATIVAS EM PLANTAS DE <i>Erythrina crista-galli</i> L. SOB CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS	45
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS.....	66

INTRODUÇÃO GERAL

Aspectos ecológicos

O Brasil é o maior país tropical do mundo, apresentando uma heterogeneidade de condições para a concentração da maior biodiversidade do planeta. As florestas tropicais são os ecossistemas com maior concentração em biodiversidade e, conseqüentemente, são as mais ameaçadas pelo avanço de novas fronteiras agrícolas e extração de madeira. Em conseqüência destas ações, a fragmentação das florestas vai alterando o equilíbrio que a natureza constituiu ao longo dos anos. A maior parte da população brasileira concentra-se em regiões próximas ao litoral e isso resultou em uma ocupação desordenada e invasiva sobre as áreas da Mata Atlântica que é atualmente um dos biomas mais devastados da América do Sul (RODRIGUES, 2007).

A Região Sul do Brasil possui três grandes tipos de formações florestais que predominam na paisagem, de leste para oeste: a Mata Atlântica, a Mata de Araucária e a Mata Subtropical da Bacia do Paraná/Uruguai (RODRIGUES, 2007). Cada uma delas ocupa diferentes territórios de acordo com as condições morfoclimáticas (Geologia, Relevo e Clima) existentes. Nos limites entre estas grandes formações, as florestas se misturam criando novas manchas de vegetação. Estas manchas se caracterizam pelo que denominamos de transições entre tipos de florestas ou transições entre florestas e campos, que compõe o mosaico dos campos sulinos (RODRIGUES, 2007).

No sul do Rio grande do sul a ocupação desordenada e sem planejamento tem ocasionado problemas sérios como a degradação das Áreas de Preservação Permanente (APP's), ocupação de áreas alagadiças por loteamentos, erosão, assoreamento e poluição por esgotos domésticos e industriais, entre outros, ocasionando uma grande perda genética na vegetação nativa. Assim, os campos perderam em muito a fisionomia natural, devido à introdução de espécies exóticas de gramíneas; os banhados foram descaracterizados em parte pela drenagem para irrigação do arroz e em parte pelo aterramento para novos loteamentos; a vegetação típica de Mata de Restinga e Áreas de Formação Pioneira vem sendo aos poucos reduzida através da retirada de lenha e de construções ilegais (RODRIGUES, 2007). Hoje, torna-se urgente a recuperação criteriosa das áreas degradadas.

A necessidade de se produzir e sistematizar conhecimentos sobre repovoamento vegetal para proteção de sistemas hídricos e a promoção da conservação de espécies vegetais, especialmente arbóreas de ocorrência regional, justificam a necessidade de desenvolver projetos ligados a políticas públicas que mostrem diretrizes norteadoras do processo de repovoamento florestal, orientando pesquisas e projetos que possam subsidiar as avaliações de impactos ambientais (BACKES; IRGANG, 2002).

Atualmente, muitos estudos interdisciplinares sobre as matas ciliares apresentam dados sobre a riqueza da biodiversidade e a importância geológica e ecológica destes ecossistemas para o equilíbrio da região onde estão situado. A heterogeneidade ambiental é certamente a principal geradora da riqueza florística e os projetos de manejo e recuperação de matas ciliares devem, portanto, levar em conta os recursos florísticos regionais (RODRIGUES; LEITÃO-FILHO, 2001). Baseando-se em levantamentos florísticos em que a corticeira aparece em baixa frequência, observa-se a importância e a necessidade de sua re-inserção em locais onde, anteriormente, já havia sido constatada sua presença (WAECHTER, 2002).

A crescente procura por sementes de espécies arbóreas nativas, principalmente na Região Centro-Sul do Brasil, deve-se ao seu uso cada vez mais intenso em programas de recuperação ambiental e de conservação de recursos hídricos (FIGLIOLIA; PIÑA-RODRIGUES, 1995). A produção de sementes de espécies florestais costuma ser irregular, dificultando a

manutenção na viabilidade e valorizando técnicas que permitam o armazenamento. Esta situação aplica-se à corticeira-do-banhado, cujas safras são inconstantes e sempre baixas (COSTA; MORAIS, 2008). As causas parecem residir tanto no comportamento intrínseco da espécie quanto na devastação dos habitats, que aumenta a endogamia e reduz ainda mais a produção de sementes (NEILL, 1993). Há ainda um forte ataque de besouros aos frutos e as sementes têm germinação irregular no tempo (CARPANEZZI, 2001). Além de produzirem poucas sementes estas perdem o poder germinativo em cerca de 180 dias (LONGHI, 1995). A ocorrência frequente de elevado número de vagens de *Erythrina crista-galli* L. totalmente danificadas por insetos e o pequeno número de mudas obtidas destas sementes atacadas são motivos de preocupação.

Tendo em vista a dificuldade na obtenção de sementes, pela baixa produção e qualidade das mesmas, tem sido realizados estudos para obtenção de mudas através da técnica de estaquia, no foi observado dificuldades na obtenção destas mudas quando as estacas são provenientes de plantas adultas. A variação nos resultados de enraizamento pode ser atribuída à constituição genética dos materiais, ao estado nutricional das estacas, à sanidade, à época de coleta das estacas, ao substrato e aos reguladores de crescimento utilizados para a indução das raízes (GRATIERI-SOSSELLA et al., 2008). Por outro lado, a diversidade genética das plantas matrizes, de acordo com o habitat, pode estar diretamente relacionada às condições internas de germinação, já que a *E. crista-galli* L. desenvolve-se tanto em banhados como em zonas urbanas (GRATIERI-SOSSELLA et al., 2008). Estas diferenças nas condições ambientais pode também contribuir para características morfo-anatômicas diferenciadas, bem como alterar o metabolismo da planta, o que acarretará alterações diretas no crescimento e no desenvolvimento das mesmas e, conseqüentemente, na produção das sementes, principal via de perpetuação da espécie.

As eritrinas encontradas no Brasil além de serem ornamentais e adequadas para o paisagismo (BACKES; IRGANG, 2002), são amplamente empregadas para recuperação de ecossistemas degradados e restauração de mata ciliar em locais com inundação periódica e de rápida duração, sendo também indicada para plantio em áreas com solo permanentemente

encharcado, além da manutenção da fauna silvestre (CARVALHO, 2003), já que as flores são procuradas por beija-flores e abelhas (LONGHI, 1995; BACKES; IRGANG, 2002). Em ecossistemas naturais, as árvores servem de suporte para grande número de espécies de orquídeas, principalmente do gênero *Cattleya* (BACKES; IRGANG, 2002), muitas delas em vias de extinção (LONGHI, 1995).

BACKES e IRGANG (2002) citam inúmeros usos para o gênero *Erythrina*, como: medicinal, madeireiro, artesanal, alimentício, ornamental e desenvolvimento de sistemas agroflorestais. O rápido crescimento das plantas, o potencial fixador de nitrogênio e a alta produção de biomassa tornam o gênero muito atrativo, sendo esse último o produto mais importante deste gênero porque protege o solo contra erosão e danos extremos de temperatura, vento e chuvas.

A possibilidade de utilização de espécies nativas, tanto para fins ornamentais como para a revegetação de áreas desprotegidas ou degradadas, depende da disponibilidade de sementes, do conhecimento dos métodos de produção de mudas e, sobretudo no caso da corticeira-do-banhado, do conhecimento das alterações fisiológicas as quais a espécie é capaz de recorrer para sobreviver em ambientes distintos.

Descrição da espécie estudada

A *E. crista-galli* L., para alguns autores, como JOLY (1998), é pertencente à família Leguminosae, subfamília Faboideae. Já CRONQUIST (1981) e LONGHI (1995) enquadram o gênero *Erythrina*, bem como os demais gêneros pertencentes à subfamília Faboideae, como componentes da família Fabaceae. As duas classificações são aceitas pela comunidade científica, no entanto, segue-se a classificação de CRONQUIST (1981) e a família é tratada como Fabaceae.

O gênero *Erythrina*, é pantropical com aproximadamente 115 espécies. A maioria das espécies é de árvores ou arbustos e poucas são ervas. Todas as espécies têm flores de coloração vermelha ou alaranjada e são polinizadas por pássaros (LONGHI, 1995). O nome *Erythrina* vem do grego “*erytros*”, que significa vermelho, em alusão à cor de suas flores.

A *E. crista-galli* L., conhecida comumente por eritrina ou corticeira-do-banhado, é uma árvore de porte médio, que ocorre no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e, no Brasil, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul, em várzeas pantanosas ou alagadiças, estando listada como planta imune ao corte pelo Conama – Conselho Nacional do Meio Ambiente (REITZ et al, 1988), tamanha a devastação de seu habitat natural. A família Fabaceae, incluindo o gênero *Erythrina*, são representantes da flora nativa do Rio Grande do Sul, relatado por WAECHTER (2002) no elemento pantropical, que engloba a flora tropical amplamente distribuída, ao menos em regiões tropicais e subtropicais americanas, africanas e asiáticas.

A corticeira-do-banhado é uma árvore regular, medindo de 6 a 8 metros de altura, caule proporcionalmente grosso (até 60 cm de diâmetro), com acúleos, embora pouco numerosos e até completamente ausentes em plantas adultas, tortuoso e suberoso de coloração acastanhada; os ramos são cilíndricos, compridos e contorcidos, às vezes quase trepadores; as folhas apresentam pecíolos longos, inermes ou com acúleos, pinadas, compostas por três folíolos peciolados rígidos, verde escuro dependendo da idade da planta e da luminosidade do ambiente, glabros, um pouco mais claros e frequentemente glaucos na parte inferior, sendo que na base de cada folíolo lateral existe uma glândula e na base do folíolo terminal duas glândulas (CORRÊA, 1984).

A copa desta espécie é irregular, principalmente no período do inverno, quando é observado o ramo arqueado e pontiagudo devido à folhagem ser decídua (SANTOS; TEIXEIRA, 2001). Os pedúnculos florais podem se apresentar solitários ou fasciculados, não bracteados, com flores de coloração que vai de rósea, em ambientes quentes, a vermelho vivo em locais mais frios (LORENZI, 1992; BRANDÃO, 2002). Na região sul as flores são bem vermelhas, fato que leva Lorenzi a tratá-la como raça geográfica. As flores estão dispostas em racemos ou cachos terminais e possuem cálice campanulado envolvendo o estandarte longo-ovado, enrolado e curvo. O fruto é uma vagem pedunculada medindo até 15 cm de comprimento, aguda nas extremidades, contendo sementes oblongas de cor castanha com hilo branco, (LORENZI, 1992).

A espécie é decídua, geralmente encontrada em lugares ensolarados, sendo claramente dependentes de luz, não ocorrendo no sub-bosque. Presente

em clareiras ou nas bordas das florestas, sendo raramente encontradas no interior da mata densa (LORENZI, 1992). Pertencendo ao grupo das pioneiras em sucessões ecológicas (RODERJAN et al, 2002), é classificada como higrófita por PAZ-BASSAGODA (2002). Floresce predominantemente durante os meses de setembro a dezembro, sendo a época de floração intimamente ligada ao fator climático temperatura. A maturação dos frutos é verificada de janeiro a março (LORENZI, 1992; BRANDÃO, 2002).

O tronco rugoso e corticoso é ótimo para a fixação de plantas epífitas e as flores vermelhas atraem beija-flores e abelhas, sendo a *E. crista-galli* L. também chamada de espécie apícola por BRANDÃO (2002). De maneira geral, as aves preferem aquelas flores de corola tubulosa e colorido vistoso, onde além do néctar possam encontrar pequenos insetos. Está comprovado que os beija-flores atuam como importantes agentes polinizadores ao se alimentarem do néctar das flores (RAGUSA-NETO, 2002). Em levantamento de espécies de plantas que poderiam ser cultivadas ou preservadas para atender à alimentação dessas aves, foram listadas várias espécies do gênero *Erythrina*, dentre elas a *E. crista-galli* L. (SATURNINO, 1978; RAGUSA-NETO, 2002). Essas são características inerentes à espécie botânica que reforçam seus valores ecológicos, desempenhando importante papel no ecossistema (LORENZI, 1992).

Desta maneira, todos os conhecimentos adquiridos sob os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são de importância fundamental para estudos de aplicação desta espécie, na arborização urbana, na revitalização de matas ciliares ou áreas sujeitas a períodos de alagamento, bem como na reestruturação de zonas degradadas e áreas de preservação permanentes.

Aspectos fisiológicos do alagamento

As plantas superiores têm absoluta exigência por oxigênio para suportar o metabolismo e o crescimento. Porém, a deficiência de oxigênio no sistema radicular ocorre com frequência na natureza (SOUZA; SODEK, 2003). Plantas crescidas em solos periodicamente ou permanentemente alagados expõem as raízes a ambientes hipóxicos. Alterações no crescimento e desenvolvimento parecem estar relacionadas aos mecanismos de tolerância

nas plantas, levando ao ajustamento metabólico, anatômico e/ou morfológico, que permite às plantas sobreviverem por períodos variáveis nestas condições (DREW, 1997).

O alagamento modifica a atmosfera do solo, pois promove deficiência de O_2 , acúmulo de CO_2 , metano, etileno, gás sulfídrico (H_2S), hidrogênio e redução da respiração aeróbica (DREW, 1997). Esse ambiente provoca alterações no metabolismo das raízes, provocando uma queda imediata na respiração das mesmas, alterando o metabolismo aeróbico para anaeróbico, reduzindo a produção de ATP e, conseqüentemente, o suprimento de energia para manter o crescimento e o desenvolvimento normal da planta. Com a finalidade de tolerar o déficit de energia promovido pela hipoxia nas raízes, as plantas redirecionam as vias metabólicas para conseguir manter a produção de ATP por meio da utilização das vias fermentativas (DAT et al., 2004).

A indisponibilidade de oxigênio paralisa a fosforilação oxidativa fazendo com que o piruvato, produzido na glicólise, seja inicialmente fermentado a lactato através da LDH (lactato desidrogenase). De acordo com DREW (1997) a alteração no pH citossólico promovida pela fermentação láctica é o fator determinante para a ativação dos genes de expressão da PDC (piruvato descarboxilase) e da ADH (álcool desidrogenase), inibindo desta forma a atividade da LDH pela formação do etanol, sendo este de menor toxicidade à planta já que é capaz de se difundir mais facilmente através das membranas.

A fermentação de carboidratos permite manter a produção de ATP sob anoxia e a reoxidação de agentes redutores essenciais para manter a glicólise. A baixa produção de energia geralmente é compensada pela aceleração da glicólise, a fim de satisfazer as exigências por ATP para manter o metabolismo do vegetal (PISICCHIO et al., 2010). A saturação da cadeia de transporte de elétrons resulta no acúmulo de NADPH e NADH e assim, altos níveis de poder redutor associados à baixa produção de energia contribuem para desencadear um processo conhecido como estresse oxidativo, produzido a partir da formação de EROs - espécies reativas de oxigênio (MUSTROPH; ALBRECHT, 2007).

As EROs são geradas espontaneamente em diferentes compartimentos celulares, como subproduto do metabolismo aeróbico. No entanto, em condições estressantes a produção de EROs pode aumentar

rapidamente. Essas moléculas, formadas por elétrons livres ou não pareados, tem uma instabilidade elétrica muito grande e, por esta razão, mesmo tendo meia-vida muito curta, apresentam alta capacidade reativa (SHARMA; DUBEY, 2005). Dentre as principais EROs que podem causar danos celulares pela oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, pode ser destacado o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (MITTLER, 2002).

Para sobreviver às condições adversas, como a hipoxia ou anoxia das raízes, as plantas recorrem a mecanismos de defesa antioxidante. O sistema antioxidante enzimático, caracterizados pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes, é de fundamental importância para aumentar a tolerância da planta ao estresse por alagamento. Dentre as principais enzimas a SOD (superóxido dismutase), a CAT (catalase) e a APX (ascorbato peroxidase) tem sido destacadas no que se refere a esse mecanismo de proteção e tolerância ao estresse (SCANDALIOS, 2005).

Apesar do estresse, existem espécies que conseguem sobreviver ao alagamento (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). Além da atividade das enzimas antioxidantes, a célula dispõe de outros mecanismos para evitar o acúmulo de EROs. Segundo MITTLER (2002), esses mecanismos incluem adaptações anatômicas, morfológicas, produção de compostos antioxidantes, alterações moleculares e mecanismos que rearranjam o aparato fotossintético e seus pigmentos.

O aparelho fotossintético é extremamente sensível ao estresse. O padrão de emissão de fluorescência pela clorofila *a* tem sido utilizado como um indicador sensível da integridade e da funcionalidade do aparelho fotossintético (LAGE-PINTO et al., 2008). Esta técnica permite estimar de forma rápida e não invasiva a eficiência do transporte de elétrons no fotossistema II (FSII), ou seja, a capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia de transporte de elétrons, fornecendo assim, informações sobre os processos fotoquímicos e não-fotoquímicos que ocorrem nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos (ROHÁČEK, 2002; YUSUF et al., 2010).

Entre as alterações morfo-anatômicas está a formação de aerênquimas, um tecido especializado no armazenamento e transporte de oxigênio e a produção de lenticelas hipertólicas que permitem a difusão do

oxigênio da parte aérea para as raízes (DREW, 1997). A formação de raízes adventícias é outra estratégia de sobrevivência ou recuperação do crescimento sob alagamento (EZIN et al., 2010).

Todas as alterações que ocorrem na planta, sejam elas de origem anatômica, morfológica, fisiológica, bioquímica ou gênica, sob alagamento, levam a um ajustamento metabólico que permite a planta sobreviver por períodos mais prolongados em condições de hipoxia ou anoxia nas raízes, caracterizando a tolerância da espécie a esta condição (DREW, 1997).

CAPÍTULO 1

Crescimento e fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Erythrina crista-galli* L. sob condições de alagamento

Growth and fluorescence of chlorophyll *a* in plants *Erythrina crista-galli* L. under flooding conditions

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações no crescimento e conteúdo de clorofila em resposta ao alagamento e avaliar possíveis danos ao FSII através da análise da fluorescência transiente da clorofila *a* por meio do Teste-JIP em plantas de *Erythrina crista-galli*, conhecida popularmente por corticeira-do-banhado. As plantas oriundas de sementes foram cultivadas em potes de 0,5 litros em casa de vegetação e transferidas para vasos de cinco litros. Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas na raiz com a manutenção de uma lâmina de água acima do solo e plantas não alagadas (controle), mantidas em capacidade de campo. As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30 e 40 dias após a indução dos tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância. O alagamento das plantas induziu a formação de lenticelas e raízes adventícias além de uma inibição no crescimento da parte aérea nos períodos iniciais, em relação às plantas do controle. No entanto, houve uma retomada do crescimento ao final do período experimental. As plantas de corticeira apresentaram uma redução no índice de clorofila em função do tempo de exposição ao alagamento. Entretanto, não houve comprometimento na capacidade de absorção de energia no FSII. Os resultados permitem concluir que a corticeira-do-banhado tolera o alagamento investindo a energia, inicialmente, na formação de estruturas morfo-anatomicas a fim de manter a difusão de oxigênio e a produção de ATP. O efeito do alagamento nas folhas é refletido no aumento da dissipação de energia através fluorescência da clorofila *a*, provavelmente, como forma de proteção do aparato fotossintetizante.

Palavras-chave: Teste-JIP. Hipoxia. Corticeira-do-banhado.

ABSTRACT

The objective was to study changes in growth and chlorophyll content in response to flooding and to assess possible damage to PSII through analysis of chlorophyll a fluorescence transient through the JIP-test plant *Erythrina crista-galli*, popularly known as corticeira-do-banhado. The plants originated from seeds were grown in 0.5 liter pots in a greenhouse and transferred to five liters pots. We used two treatments: root plants flooded with maintaining a water level above the ground and plants are not flooded (control), maintained at field capacity. Evaluations were performed at 10, 20, 30 and 40 days after induction treatments. The experimental design was randomized blocks and the results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and analyzed by comparison of means by Tukey test at 5% significance. The results showed the formation of lenticels and adventitious roots as well as a reduction in shoot growth in earlier periods, as compared to the control. However, there was a resumption of growth at the end of the trial period. Cork plants showed a reduction in chlorophyll content as a function of time of exposure to flooding. However, there was no impairment in the ability to absorb energy in PSII. The results indicate that the corticeira-do-banhado tolerate flooding investing the energy initially in the formation of morpho-anatomical structures in order to keep the diffusion of oxygen and ATP production. The effect of flooding on the leaves is reflected in the increase of the dissipation of energy through chlorophyll a fluorescence, probably as a way of protecting the photosynthetic apparatus.

Keywords: Test-JIP. Hypoxia. Corticeira-do-banhado.

INTRODUÇÃO

A *Erythrina crista-galli* L., conhecida comumente por eritrina ou corticeira-do-banhado, é uma árvore de porte médio, fixadora de nitrogênio, que ocorre no Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia e, no Brasil, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul (LORENZI, 2008). A corticeira está listada como planta imune ao corte, pelo CONAMA (REITZ, 1988), tamanha é a devastação de seu habitat natural. As eritrinas são amplamente empregadas para recuperação de ecossistemas degradados e restauração de mata ciliar em locais com inundação periódica e de rápida duração, contribuindo para a manutenção da fauna e flora silvestre, já que suas flores são polinizadas por beija-flores e servem de suporte para diversas espécies de epífitas em extinção (CARVALHO, 2003).

A espécie tem despertado o interesse dos pesquisadores nos últimos anos. A sua utilização em paisagismo (COSTA; MORAIS, 2008), questões relativas a superação da dormência das sementes desta espécie (SILVA et al,

2006), bem como as melhores condições para a multiplicação da mesma através de estacas (CARPANEZZI et al., 2001).

A ocorrência de inundações são eventos comuns em diversos ecossistemas. A redução na disponibilidade de oxigênio no solo constitui a maior restrição para o crescimento das plantas sob alagamento (MEDINA et al., 2009). Durante um evento de alagamento, os espaços no solo, antes preenchidos por gases atmosféricos, tornam-se preenchidos por água, o que dificulta a difusão de oxigênio para as raízes (PISICCHIO et al., 2010). Sob condições de alagamento a planta pode apresentar estratégias específicas de tolerância para garantir sua sobrevivência frente à saturação hídrica do solo e, conseqüentemente à anoxia, que possibilitem o seu estabelecimento nesse ambiente (POVH et al., 2005).

Dentre as espécies tolerantes, algumas crescem e se desenvolvem melhor sob alagamento apresentando alterações morfo-anatômicas que auxiliam na reposição do oxigênio interno da planta. Outras investem menos no crescimento, reduzindo o consumo de energia, sendo este retomado ao final do período de estresse (MEDRI et al., 2007). Dentre as alterações morfo-anatômicas utilizadas como estratégia de tolerância ao alagamento está a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertróficas, redução no crescimento da parte aérea e da raiz (EZIN et al., 2010), além da formação de aerênquimas (BIANCHINI et al., 2000) e, como alterações fisiológicas, o decréscimo no consumo de oxigênio pelas raízes, da taxa fotossintética e da condutância estomática (PISICCHIO et al., 2010).

O aparato fotossintético, em especial o fotossistema II (FSII), é muito sensível às diferenças nas condições ambientais a que as plantas são submetidas. Desta forma, qualquer dano ocasionado neste fotossistema em função do estresse por alagamento pode ser monitorado através da análise da fluorescência transiente da clorofila *a* (YUSUF et al., 2010). A análise da fluorescência da clorofila tem-se revelado um método sensível, rápido e não invasivo para a detecção e quantificação das alterações induzidas no aparato fotossintético (YUSUF et al., 2010).

A ocorrência de uma espécie em uma área naturalmente inundável é um forte indício de sua tolerância. Nos últimos anos tem aumentado o número de trabalhos que tratam de espécies florestais, porém as estratégias de

tolerância ao alagamento apresentadas por elas não estão completamente elucidadas. Assim, todos os conhecimentos adquiridos sob os aspectos fisiológicos e morfológicos são de importância fundamental para estudos de manejo e utilização desta e outras espécies afins em áreas alagáveis.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar as alterações no crescimento e índice de clorofila em resposta ao alagamento e avaliar possíveis danos ao FSII através da análise da fluorescência transiente da clorofila a por meio do Teste-JIP.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições do experimento

Para o desenvolvimento do experimento foram utilizadas plantas de *E. crista-galli* L. obtidas a partir da germinação de sementes coletadas de indivíduos adultos presentes no Campus da Universidade Federal de Pelotas-Capão do Leão – RS. As sementes foram previamente escarificadas com lixa número 80 no lado posterior ao hilo e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 5% durante cinco minutos. Em seguida, as mesmas foram semeadas em vasos plásticos de 0,5L contendo substrato comercial (Plantmax) permanecendo por um período de um mês. Sete dias após a emergência iniciou-se a aplicação de 0,2L de solução nutritiva HOAGLAND e ARNON (1938) meia força, pH ajustado para 6,0-6,5, a qual foi repetida a cada dois dias durante todo o período experimental. Após os três meses, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos perfurados, com capacidade de cinco litros, contendo uma mistura de solo e areia lavada (1:1), e desenvolvidas em casa de vegetação por mais três meses, ao final do qual foram então submetidas aos tratamentos.

Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas, onde os vasos foram colocados dentro de vasos plásticos, não perfurados, com capacidade de 10L e com a manutenção de uma lâmina de água, de no mínimo três centímetros acima do solo, durante todo o experimento e plantas não alagadas (controle), irrigadas diariamente. As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30 e 40 dias após a indução dos tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso constituído de dois tratamentos, quatro períodos de avaliação, quatro repetições e duas plantas por repetição.

Parâmetros de crescimento

Os parâmetros de crescimento avaliados, em cada período de coleta, foram: altura das plantas, determinada por medição com régua métrica, a partir da base da planta até a inserção do ápice meristemático e resultados expressos em cm planta⁻¹; área foliar, através de medidor de área foliar da marca Licor, modelo LI-3000 e os resultados expressos em mm² planta⁻¹; número de folhas; diâmetro do caule (medido dois centímetros acima do solo), determinado com o auxílio de um paquímetro e os resultados expressos em mm planta⁻¹; massa seca das folhas, caules e sistema radicular, mensurados em balança analítica, após secagem do material em estufa de ventilação forçada a 70 °C ± 2°C até peso constante e os resultados expressos em mg planta⁻¹ e comprimento da raiz, determinada por medição com régua métrica com resultados expressos em cm planta⁻¹.

Análise da fluorescência transiente da clorofila a (Teste-JIP)

Em cada período de avaliação, folhas maduras completamente expandidas foram usadas para as medidas da fluorescência da clorofila a usando um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). As avaliações foram realizadas em cinco folhas de cada planta. As folhas, após adaptadas ao escuro por 60 minutos receberam um pulso de irradiância saturante de aproximadamente 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons, durante um segundo. A intensidade da fluorescência foi medida em 50, 100, 300 μs , 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) e a F_M (fluorescência máxima). A partir das intensidades de fluorescência foram calculados os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995). A interpretação dos parâmetros medidos e calculados a partir deste teste fornece numerosas informações dos fluxos de energia através do FSII em diferentes níveis (STRASSER; SRIVASTAVA; TSIMILLI-MICHAEL, 2004).

Índice de clorofila

O conteúdo de clorofila foi estimado por um medidor de clorofila portátil (CL- 01, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Foi utilizado para a avaliação o folíolo central da quarta folha a contar do ápice caulinar e os resultados foram expressos como Índice de clorofila (CASSOL et al., 2008).

Análise estatística

Os dados obtidos na análise dos parâmetros de crescimento e no índice de clorofila foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância através do programa WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

RESULTADOS

Parâmetros de crescimento

Ao final do período experimental, todas as plantas sobreviveram independente dos tratamentos aplicados, embora tenham apresentado algumas características diferentes em função da condição hídrica a que foram submetidas. As plantas alagadas desenvolveram raízes adventícias a partir do primeiro período de avaliação (10 dias) e formação de lenticelas hipertróficas e rachaduras corticais na base do caule, sendo estas últimas mais evidentes aos 40 dias de alagamento (Fig. 1).

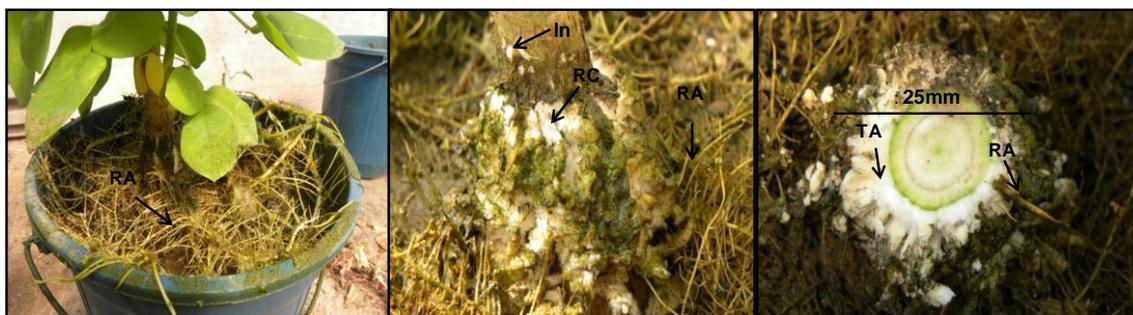


FIGURA 1. Formação de raízes adventícias (RA), rachaduras caulinares (RC), lenticelas hipertróficas (In) e tecido aerenquimático (TA) em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento durante 40 dias.

Em relação à altura das plantas, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre os períodos avaliados ($P=0,014$) e entre os tratamentos ($P=0,017$) não mostrando, no entanto, interação entre estes fatores ($P<0,05$). Ocorreu uma paralisação no crescimento das plantas alagadas a partir dos 20 dias de tratamento, sendo que aos 30 dias de submissão ao alagamento apresentavam-se 40% menores que as plantas controle. No entanto, aos 40 dias de tratamento observou-se uma retomada do crescimento destas plantas, não ocorrendo diferenças significativas em relação às plantas controle (Fig. 2A).

Quanto ao número de folhas foi observada diferença significativa entre os períodos avaliados ($P=0,05$) e entre os regimes hídricos ($P<0,05$), sem interação entre os fatores. As plantas alagadas apresentaram, aos 20 e 30 dias do início do tratamento, um desfolhamento, com 50% de queda das folhas, em relação à primeira avaliação (10 dias) e diferindo igualmente das plantas controle, neste mesmo período. No entanto, ao final do período de avaliação houve uma recuperação em relação aos valores iniciais, porém, sempre diferindo estatisticamente das plantas controle (Fig. 2B). O alagamento, desta forma, promoveu redução na área foliar mostrando interação entre a condição hídrica e o tempo de exposição ao tratamento ($P=0,019$) não alcançando, desta forma, valores próximos ao controle sendo que estas apresentaram, ao final do período experimental, valores até 100% superiores as plantas alagadas (Fig. 2C).

Para a variável massa seca das folhas foi observado diferença significativa entre os períodos avaliados ($P<0,05$) e entre os regimes hídricos estudados ($P<0,05$) assim como a interação entre eles ($P<0,05$). O alagamento promoveu menor incremento em massa seca das folhas já a partir dos 20 dias de avaliação, com recuperação posterior aos 40 dias. No entanto, os valores obtidos nestas plantas foram 50% menores que os obtidos nas plantas não alagadas (Fig. 2D). Já o comprimento do sistema radicular foi reduzido aos 10 dias de tratamento, não diferindo entre si ao longo dos três primeiros períodos de avaliação, porém alcançando valores semelhantes às plantas controle ao final do período experimental (Fig. 2E), mostrando diferença estatística apenas entre os dois tratamentos ($P<0,05$). Esta redução nos parâmetros anteriores

também foi observada na massa seca das raízes das plantas alagadas, principalmente nos 20 primeiros dias do início do tratamento e, como observado anteriormente, ocorreu um incremento significativo desta massa seca no final do experimento, de até 200% em relação aos primeiros dias de alagamento e 100% em relação às plantas do tratamento controle (Fig. 2F).

A massa seca do caule não foi afetada pelo alagamento (Fig. 2G). No entanto, o diâmetro do caule mostrou interação entre tempo e regime hídrico ($P < 0,05$), sendo esta variável significativamente incrementada aos 30 dias de tratamento chegando, ao final do experimento, com valores 100% maiores em relação às plantas controle (Fig. 2H).

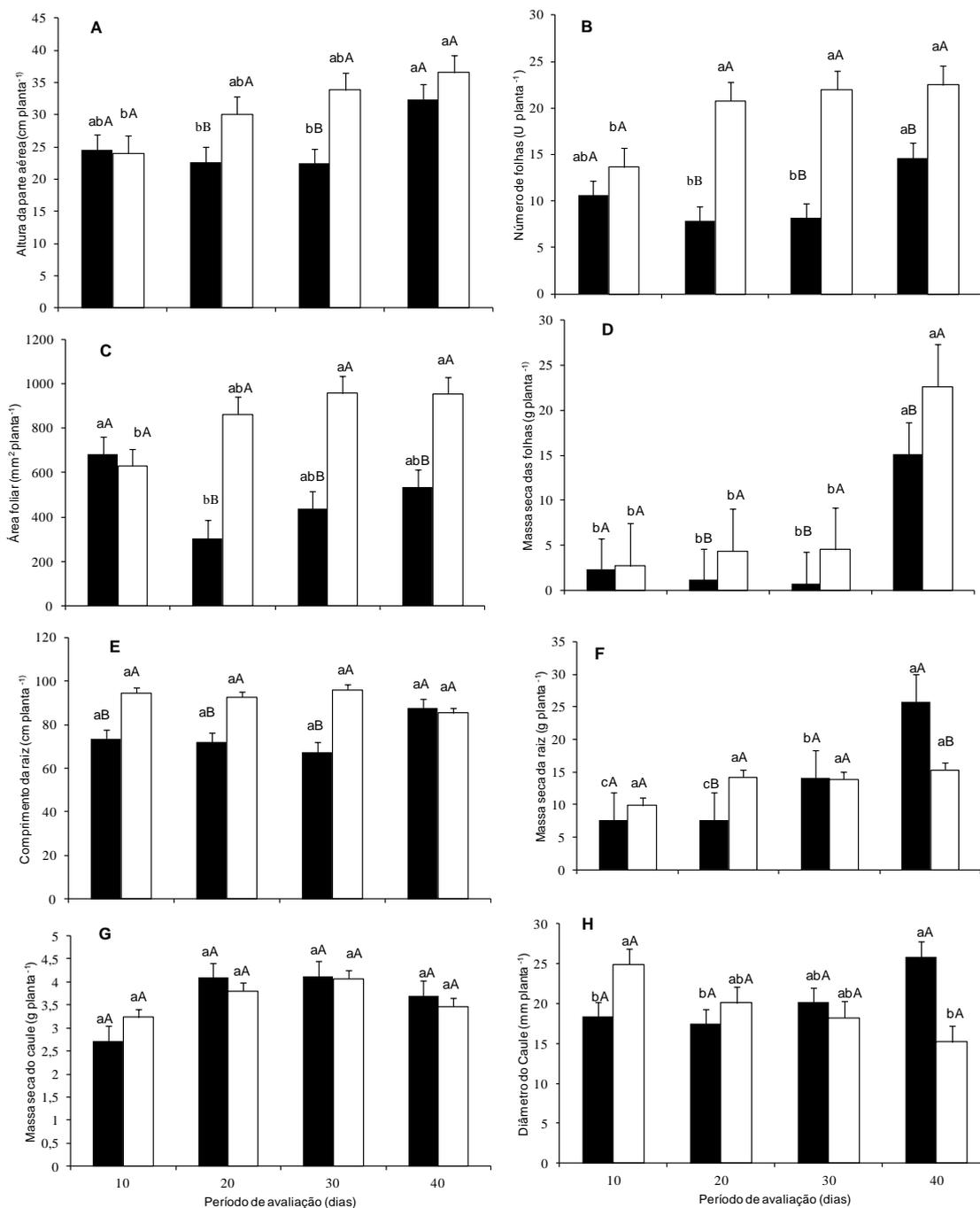


FIGURA 2. Altura da parte aérea (A), Número de folhas (B), Área foliar (C) e Massa seca das folhas (D), Comprimento da raiz (E), Massa seca da raiz (F), Massa seca do caule (G) e Diâmetro do caule (H) de plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento (■) e não alagadas (□) durante quatro períodos de avaliação. Valores seguidos por letras maiúsculas (regime hídrico) e letras minúsculas (tempo de alagamento) iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Análise da fluorescência transiente da clorofila a:

A avaliação da fluorescência transiente da clorofila *a* fornece parâmetros capazes de descrever o comportamento fotossintético do FSII. Alguns destes parâmetros da fluorescência transiente da clorofila *a*, deduzidos do teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995) estão representados na forma de gráfico de radar (Fig. 3), sendo que todos os valores foram normalizados em relação às plantas do tratamento controle.

Os parâmetros relacionados ao fluxo específico ou fluxo por centro de reação (RC) no FSII, demonstram que houve diferenças, entre os dois tratamentos, em função do tempo de alagamento a que as plantas estiveram submetidas. O fluxo de elétrons absorvidos por centro de reação (ABS/RC) e a capacidade de captura de elétrons por centro de reação (TR_0/RC) foram crescentes nas plantas alagadas em função do tempo. No entanto, o fluxo de elétrons transferidos por centro de reação (ET_0/RC) foi reduzido já no início do alagamento sugerindo uma queda na capacidade de transferência de elétrons para os carreadores de elétrons do FSII. A razão DI_0/RC teve um aumento crescente, chegando até 100% no último período de alagamento avaliado em relação ao controle. Este parâmetro refere-se a dissipação de energia, sugerindo que o tempo de alagamento proporcionou uma maior dissipação do fluxo de energia, seja na forma de calor ou fluorescência.

Para os parâmetros que descrevem o rendimento quântico observa-se que não houve diferenças entre os tratamentos para o rendimento quântico máximo fotoquímico ($\Phi_{P0} = TR_0/ABS = Fv/FM$). Mas Φ_{E0} (ET_0/ABS), rendimento quântico do transporte de elétrons de Q_A^- para os aceptores de elétrons do intersistema, foi reduzido, especialmente, aos 40 dias de alagamento. No entanto Φ_{D0} , rendimento quântico de dissipação de energia, aumentou com o tempo de alagamento.

Em relação aos parâmetros que avaliam a eficiência, foi observado que ψE_0 (ET_0/ TR_0), parâmetro que estima a eficiência com que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron de Q_A^- para os aceptores de elétrons do intersistema, foi reduzido em todos os períodos de alagamento.

O índice de performance de absorção (PI_{ABS}) declinou consideravelmente aos dez dias de alagamento, alcançando valores até 50% menores que o controle já aos 20 dias de tratamento, mantendo-se em decréscimo até o final.

Índice de clorofila

Os resultados da avaliação do índice de clorofila demonstraram que o alagamento teve um efeito deletério para este parâmetro. Houve uma redução significativa no conteúdo de clorofila em função do tempo de alagamento ($P=0,02$) (Fig. 4). Mesmo não sendo demonstrada a interação entre o regime hídrico e o tempo de exposição ao alagamento para esta variável, os resultados obtidos para as plantas alagadas mostraram diferenças estatística ($P<0,05$) em relação às plantas controle. As plantas alagadas apresentaram redução neste parâmetro a partir dos 20 dias de tratamento quando comparadas as não alagadas e diferentes entre si desde a primeira avaliação até o final do período experimental, com valores 50% inferiores aos valores iniciais.

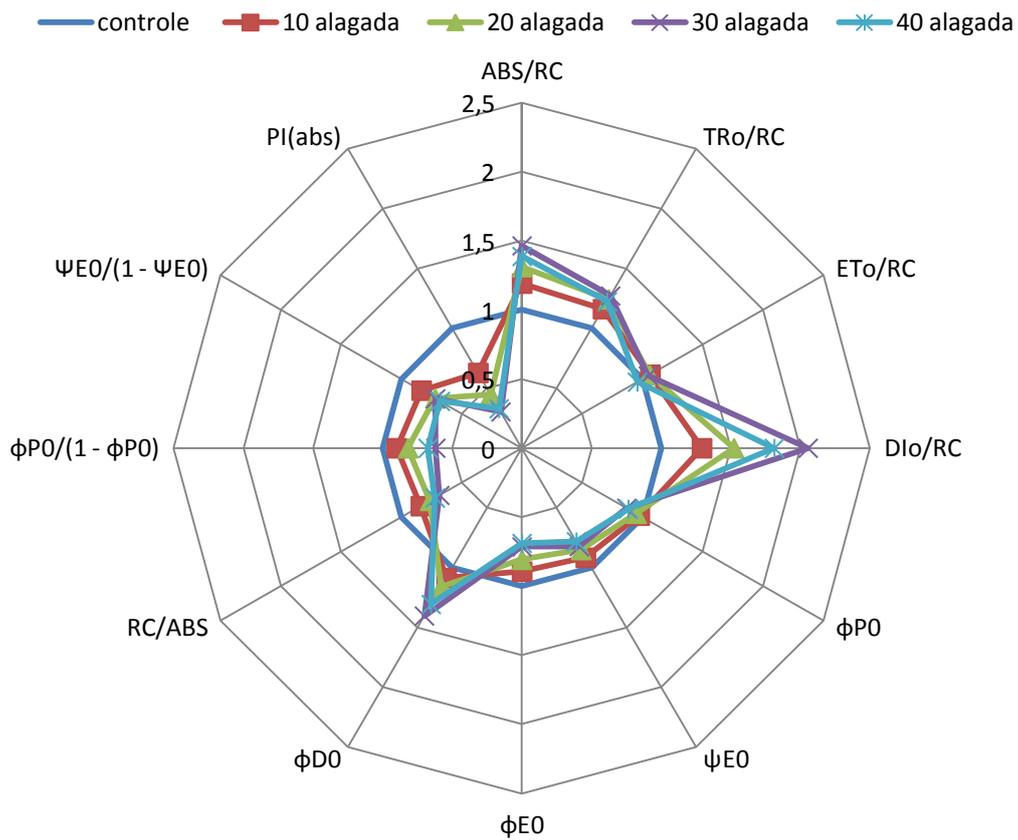


FIGURA 3. Parâmetros fotossintéticos deduzidos de análise por Teste-JIP da fluorescência transiente da clorofila *a* em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento durante quatro períodos (10, 20, 30 e 40 dias).

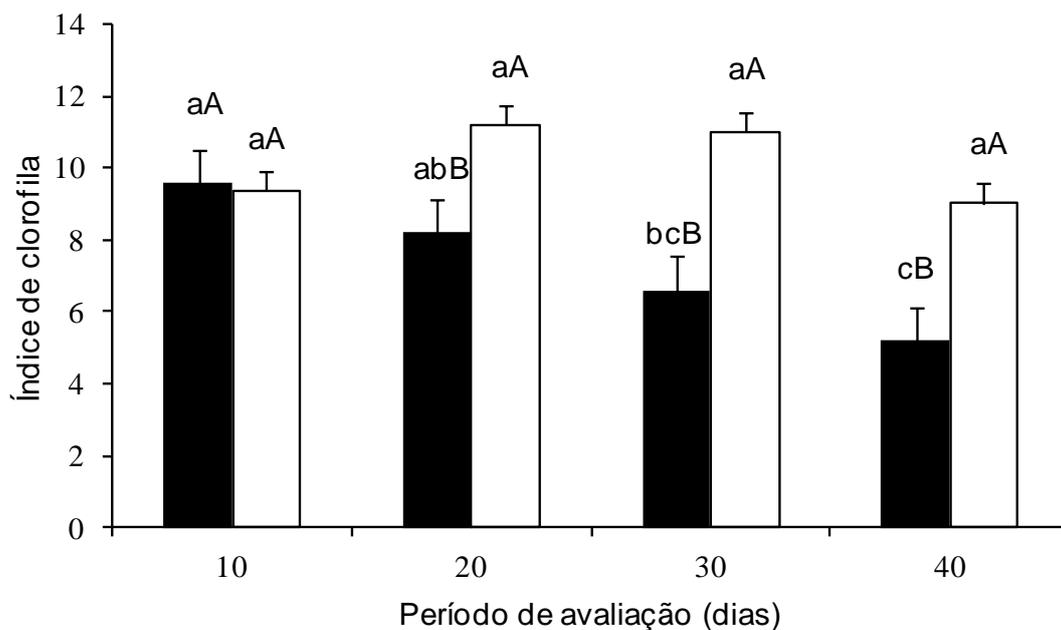


FIGURA 4. Índice de clorofila em plantas de *E. crista-galli* L. submetidas ao alagamento (■) e não alagadas (□) durante quatro períodos de avaliação (10, 20, 30 e 40 dias). Valores seguidos por letras maiúsculas (regime hídrico) e letras minúsculas (tempo de alagamento) iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

DISCUSSÃO

A *E. crista-galli* L., recorreu como forma de manter o metabolismo normal sob condição de alagamento, a formação de lenticelas e de raízes adventícias (Fig. 1). A literatura registra vários ensaios cuja carência de oxigênio prolongada leva muitas espécies a desenvolverem raízes adventícias, aerênquimas e também a formação de rachaduras corticais ou peridérmicas em caules, resultantes de hipertrofia (DAVANSO et al., 2002; BATISTA et al., 2008). Assim como ocorreu em trabalhos com *Heliocarpus popayanensis* Kunth (PISICCHIO et al., 2010), *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (POVH et al, 2005) e *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (MEDRI et al, 2007) que tiveram formação de raízes adventícias e lenticelas hipertróficas na base do caule como estratégia de sobrevivência ao alagamento.

Ao serem submetidas ao alagamento, as plantas produzem sinais metabólicos de vários tipos, em resposta à diminuição dos níveis endógenos de

oxigênio. Nesse período elas alteram sua arquitetura, anatomia, metabolismo e crescimento como estratégia de sobrevivência (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

Um dos mecanismos de sinalização é um aumento nos níveis de etileno pelo aumento da ACC Sintase, o que resulta na atividade de celulases, e degradação das paredes celulares contribuindo assim para a formação de aerênquimas do tipo lisígeno (GRANDIS et al., 2010). O etileno também induz a hipertrofia de lenticelas, que ocorrem na base dos caules e induzem a formação de aerênquimas, favorecendo a difusão dos gases no interior dos tecidos. Alterações no balanço hormonal modificam a razão auxina:citocinina levando a formação de raízes adventícias (GRANDIS et al., 2010), assim como foi observado nesse trabalho após os 10 dias de exposição ao alagamento.

O alagamento promoveu uma paralisação no crescimento da parte aérea de *E. crista-galli* L. chegando a um decréscimo de até 40% aos 30 dias (Fig 2A). O alagamento, em geral, reduz o crescimento e afeta a partição de carbono (LOPES-KURSAR, 2003), causando efeitos deletérios nos períodos iniciais, por reduzir drasticamente a assimilação de CO₂. Assim como ocorreu em *Erythrina speciosa* Andrews (MEDINA et al., 2009) sob alagamento, em que a taxa de assimilação apresentou redução de 90% em relação as plantas do controle, reduzindo também o crescimento em altura.

No entanto, após um período de adaptação, já no final do período experimental, ocorreu uma retomada no crescimento alcançando valores bem próximos ao controle (40 dias). Nas plantas alagadas da espécie em estudo, não houve redução de massa seca no caule (Fig. 2G), foi verificado um incremento no diâmetro do mesmo pela presença de lenticelas hipertróficas (Fig. 2H) e um incremento na biomassa das raízes aos 40 dias de experimento (Fig. 2F), corroborando também com os resultados encontrados para *E. speciosa* (MEDINA et al., 2009). Estes dados estão de acordo com os encontrados em *Jacaranda puberula* Cham. (PIMENTA, 1996), *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (BIANCHINI et al, 2000), *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl., *Campomanesia xanthocarpa* Berg. (MEDRI et al, 1998) e em *Lithraea molleoides* (Vell) Engl. (MEDRI et al, 2007) quando estas espécies foram submetidas ao alagamento das raízes.

Plantas inundadas de *Piptadenia gonoacantha* (Marth.) apresentaram, aos 60 dias, maior razão parte aérea/raiz. Esse resultado indica que o crescimento radical foi mais drasticamente reduzido que o da parte aérea (FERREIRA et al., 2001). Esta resposta é esperada, pois as raízes são os órgãos mais diretamente afetados pela inundação, sendo tipicamente mais reduzidos que a parte aérea (KOZLOWSKI, 1997). No entanto em *E. crista-galli* L. o comprimento e a alocação de matéria seca nas raízes, reduzidos pelo alagamento nos períodos iniciais, foi incrementado ao final equiparando-se e até superando os valores iniciais e os valores do tratamento controle para a variável massa seca (Fig. 2F), indicando que houve um maior investimento de energia nas raízes como forma de superar o período de estresse.

O desfolhamento seguido da redução na área foliar (Fig. 2B e 2C), como consequência da abscisão foliar em *E. crista-galli* L., pode ser resultado da alteração no balanço hormonal proporcionada pela hipoxia no substrato e do desvio da energia para a produção de raízes adventícias. No entanto, estes resultados indicam apenas uma adaptação inicial já que os valores de área foliar e número de folhas apresentaram uma retomada no crescimento ao final do experimento.

Os parâmetros obtidos pelo Teste-JIP (Fig. 3), que avaliam a fluorescência da clorofila *a*, demonstraram que, apesar da capacidade de absorção (ABS/RC) e captura (TR_0/RC) de fótons pelos centros de reação do FSII não terem sido comprometidas, houve elevação na dissipação de energia (DI_0/RC) contribuindo para a redução do rendimento quântico de transporte de elétrons (Φ_{E0}) reduzindo a eficiência de deslocamento de fótons para o intersistema ($\psi_0=ET_0/ TR_0$).

Ainda, o alagamento comprometeu a eficiência fotossintética na corticeira-do-banhado, já que houve uma redução no  ndice de performance (PI_{ABS}) desde o primeiro período de avaliação, mantendo-se em decréscimo ao longo do experimento. O PI_{ABS} fornece informações adicionais sobre a funcionalidade do sistema fotossintético em plantas, incluindo componentes que descrevem a quantidade de centros de reação por clorofila fotossinteticamente ativas (RC / ABS), o fluxo máximo de energia que atinge o

centro de reação do FSII [$\phi P0 / (1 - \phi P0)$] e o transporte de elétrons no início da iluminação [$\Psi E0 / (1 - \Psi E0)$] (STRASSER et al, 1995).

A inundação induziu um decréscimo no $\Phi PSII$ em *Spartina densiflora* Brong. como consequência da diminuição dos quenching fotoquímicos e um aumento no coeficiente de extinção não fotoquímico, indicando uma dissipação para proteger os centros de reação de lesões induzidas pela luz (MAXWELL - JOHNSON, 2000) e apesar destes resultados, o crescimento só foi afetado depois de 60 dias de inundação. REGINFO et al. (2001) também constataram um aumento no quenching não fotoquímico com o alagamento em árvores adultas de *Eschweilera tenuifolia* O.Berg. (Miers). O quenching não fotoquímico pode ser caracterizado pelo aumento na dissipação na forma de fluorescência ou de calor e um aumento nos valores deste sob estresse pode indicar uma adaptação fotossintética (PANDA et al., 2006).

Os efeitos do alagamento no FSII dependem do grau de submergência (total ou parcial) e do tempo de exposição a esta condição. Em *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. o conteúdo de pigmentos foi reduzido sem posterior recuperação e a eficiência fotoquímica do FSII foi afetada pela submersão exibindo níveis de recuperação dependentes da duração e do grau de submersão (MAUCHAMP - MÉTHY, 2004).

Os resultados obtidos na avaliação do índice de clorofila (Fig. 5) demonstram que, apesar da redução no conteúdo de clorofila, nas plantas alagadas, ao longo do período de avaliação, não houve comprometimento na capacidade de absorção e de captura de energia no FSII (Fig. 3). Assim, na corticeira-do-banhado, o aumento na dissipação de energia pode ter sido utilizada como forma de proteção do aparato fotossintético.

A aclimação das plantas ao alagamento provavelmente só ocorre porque o processo é lento. A submersão, mesmo que parcial, representa para as plantas um período desfavorável que implica na queda das folhas, redução na formação de novas folhas e na assimilação fotossintética (PAROLIN, 2000).

Como o crescimento da raiz está intimamente relacionado com a importação de carboidratos da parte aérea (FARRAR - JONES, 2000; NAGEL et al., 2006), a recuperação das raízes pode ser limitada pela supressão da exportação de carboidratos (SLEWINSKI-BRAUN, 2010). No entanto, os resultados indicam que as reservas, em *E. crista-galli* L., foram direcionadas

para a formação das raízes adventícias e lenticelas como forma de manter o metabolismo sob hipoxia, permitindo a difusão de oxigênio pelos tecidos a partir da base do caule. O desvio da energia do crescimento da parte aérea para o sistema radicular sugere que esse investimento energético nas raízes funcione como uma estratégia adaptativa inicial fazendo com que seja possível a retomada do crescimento mesmo após um longo período de submissão ao alagamento.

Desta forma, a adaptação ao alagamento não é regulada de forma isolada, os mecanismos envolvidos fazem parte de um grupo de fatores como hormônios, degradação de amido, síntese de aminoácidos, atividade de enzimas do metabolismo anaeróbico, eficiência fotossintética, mecanismo de remoção de espécies reativas de oxigênio, entre outros (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

Além disso, o estresse por inundação ou alagamento é um complexo que envolve alterações em substâncias como etileno, gás carbônico, oxigênio, produção de ROS e fitotoxinas dentro e fora da planta. Mudanças nestas substâncias são fortemente controladas pelo tipo de alagamento (água com interferência luminosa ou turva) e pelo órgão (raiz e/ou parte aérea) em submersão. A especificidade ao grau de submergência e às condições ambientais vai definir o equilíbrio adequado entre todos os fatores envolvidos e a tolerância de cada espécie (LUO et al., 2011).

Nas condições em que foi desenvolvido este trabalho, os resultados obtidos permitem afirmar que as plantas de *E. crista-galli* L. continuaram a se desenvolver mesmo sob alagamento, apesar de apresentarem valores significativamente menores em relação as plantas não alagadas, apresentando desta forma, comportamento que pode caracterizar a espécie como tolerante ao alagamento, devendo ser considerado que outras variáveis, além das abordadas neste estudo, contribuem para estabelecer ou não a tolerância de uma espécie à condição de hipoxia ou anoxia como, por exemplo, fatores de natureza bioquímica, metabólica e gênica.

CONCLUSÕES

A corticeira-do-banhado tolera o alagamento investindo a energia, nos períodos iniciais de submersão, na formação de estruturas morfo-anatômicas como o desenvolvimento de lenticelas e raízes adventícias a fim de manter a difusão de oxigênio nos tecidos e a produção de ATP. Esse investimento inicial oferece à planta um suporte para os ajustamentos metabólicos necessários para voltar a investir no crescimento da parte aérea. O efeito do alagamento nas folhas é refletido no aumento da dissipação de energia através da fluorescência da clorofila *a*, provavelmente, como forma de proteção do aparato fotossintetizante.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E METABOLISMO FERMENTATIVO EM PLANTAS DE *Erythrina crista-galli* L. SOB CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO

Antioxidant and fermentative enzymes activity in plants of *Erythrina crista-galli* L. under flooding conditions

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar o nível de tolerância ao alagamento das raízes, em mudas de *Erythrina crista-galli* L., através da dosagem da atividade das enzimas antioxidantes, quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas e raízes, bem como a dosagem da atividade das enzimas fermentativas nas raízes. Plantas oriundas de sementes foram cultivadas em vasos de 0,5 litros em casa de vegetação e transferidas para vasos de cinco litros. Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas na raiz com a manutenção de uma lâmina de água acima do solo e plantas não alagadas (controle). As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a indução dos tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância. Em cada período foram avaliadas a atividade da catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, quantificação de peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica em folhas, raízes e raízes adventícias além da atividade das enzimas lactato desidrogenase, piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase nas raízes principais e adventícias. Foi verificado um aumento na atividade das enzimas ascorbato peroxidase e catalase nas folhas para manter estáveis os níveis de H_2O_2 , o que proporcionou redução na peroxidação lipídica. Nas raízes foi verificada uma atuação mais marcante de todas as enzimas antioxidantes até os 30 dias de alagamento, favorecendo a redução nos níveis de H_2O_2 e de peroxidação de lipídios. A atividade das enzimas fermentativas foi evidenciada nas raízes principais desde o início do estresse, no entanto nas raízes adventícias só foi requerida

nos períodos finais. Pode-se concluir que a *E. crista-galli* L., depende das raízes adventícias e, em especial, da utilização da rota fermentativa para tolerar a condição de alagamento.

Palavras-chave: hipoxia, estresse oxidativo, enzimas, “Corticeira-do-banhado”

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the flooding tolerance level in *Erythrina crista-galli* L. seedling roots, through leaves and roots dosage of antioxidant enzymes activity, hydrogen peroxide quantification and lipid peroxidation, and determination of fermentative enzymes activity in the roots. Plants derived from seeds were grown in 0,5 liters pots inside a greenhouse and transferred to five liters pots. The plants were treated as follow: flooded roots were maintained with above ground water level or not flooded (control). The evaluations were performed at 10, 20, 30, 40 and 50 days after starting the treatments. The experimental design was randomized blocks and the results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and analyzed by comparison of means by Tukey test at 5% significance. The catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase activity, hydrogen peroxide quantification and lipid peroxidation in leaves, roots and adventitious roots, as well as lactate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase activity of the enzymes in primary and adventitious roots were evaluated in each sample. There was an increased activity of ascorbate peroxidase and catalase enzymes in leaves to keep H₂O₂ levels, leading to decrease in lipid peroxidation. In the roots was found a more striking of all antioxidant enzymes up to 30 days of flooding, thus promoting a reduction in the levels of H₂O₂ and lipid peroxidation. In main roots, the fermentative enzymes activity was observed since stress began, however in adventitious roots it was required only in later periods. In conclusion, *E. crista-galli* L. is dependent of adventitious roots and, in particular the use of fermentative route to tolerate roots flooding subjection.

Keywords: hypoxia, oxidative stress, enzymes, “Corticeira-do-banhado”

INTRODUÇÃO

A *Erythrina crista-galli* L., popularmente conhecida como corticeira-do-banhado, é uma árvore de porte médio, pertencente à família fabaceae, conhecida, especialmente, pela coloração vibrante de suas flores que servem como atrativo para polinizadores como os beija-flores, além de servir como

habitat preferencial de espécies de epífitas em vias de extinção (LORENZI, 2008). A família Fabaceae, incluindo o gênero *Erythrina*, é representante da flora nativa do Rio Grande do Sul, relatado por WAECHTER (2002) no elemento pantropical, que engloba a flora tropical amplamente distribuída, ao menos em regiões tropicais e subtropicais americanas, africanas e asiáticas. A corticeira está listada como planta imune ao corte, pelo CONAMA (REITZ, 1988), tamanha é a devastação do seu habitat natural e devido a sua importância na recuperação de ecossistemas degradados e restauração de mata ciliar em locais com inundação periódica e de rápida duração.

A capacidade das espécies de se mostrarem tolerantes e adaptadas a períodos de encharcamento ou inundação do solo pode ser atribuída a mecanismos de adaptação morfo-anatômicos, fisiológicos e bioquímicos (ISHIDA et al., 2002). Dependendo da espécie, da velocidade de encharcamento do solo, da altura da lâmina d'água e do tempo de submersão, esses mecanismos podem ser mais evidentes, favorecendo a sobrevivência das plantas nestes ambientes (ISHIDA et al., 2002). Dentre as alterações morfo-anatômicas utilizadas como estratégia de tolerância ao alagamento está a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertróficas (EZIN et al., 2010).

O excesso de água diminui a difusão de gases reduzindo a disponibilidade de oxigênio no solo e, conseqüentemente, para o sistema radicular das plantas. Essa depleção na disponibilidade de oxigênio sinaliza para um estresse abiótico fazendo, desta forma, com que a planta altere o seu metabolismo normal (DAT et al., 2004).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente produzidas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos durante o metabolismo normal da planta. No entanto, a produção e remoção destas EROs são extremamente controladas (APEL; HIRT, 2004). Contudo, esse equilíbrio pode ser alterado por diversos fatores, como por exemplo, o excesso de água nas raízes.

O equilíbrio entre a produção aumentada de EROs e a capacidade de acionar rapidamente o sistema de defesa antioxidante vai refletir na resposta da planta ao estresse e, conseqüentemente, na sua adaptação e/ou tolerância à condição adversa proporcionada pelo alagamento (MITTLER, 2002). Nessa condição a planta reduz o crescimento e direciona suas reservas para manter o metabolismo ativo em órgãos com crescimento preferencial além de ativar o

sistema antioxidante enzimático, aumentando a atividade de enzimas como a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e APX (ascorbato peroxidase). Desta forma, o monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes pode ser utilizado como indicativo de estresse oxidativo em plantas.

A fim de suprimir o déficit de energia promovido pelo alagamento, com a paralisação da respiração aeróbica, algumas espécies redirecionam as vias metabólicas para garantir a produção de ATP pelo aumento na taxa de fermentação dos carboidratos, elevando, desta forma, a atividade das enzimas LDH (lactato desidrogenase), PDC (piruvato descarboxilase) e ADH (álcool desidrogenase) (DREW, 1997).

A maioria dos trabalhos realizados sobre vias de sinalização e tolerância ao alagamento utiliza plantas como milho, arroz, girassol e *Arabidopsis* (GRANDIS et al., 2010) e ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na aclimação de plantas de espécies florestais submetidas a este tipo de estresse. Entender esses mecanismos é de grande importância e terá um impacto positivo no conhecimento da relação entre a biodiversidade de espécies florestais e as condições ambientais.

Desta maneira, todos os conhecimentos adquiridos sob os aspectos fisiológicos e bioquímicos da *E. crista-galli* L. são de importância fundamental para estudos de aplicação da espécie em estudo, na revitalização de matas ciliares, bem como reestruturação de zonas degradadas.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi determinar o nível de tolerância ao estresse ocasionado por diferenças nas condições hídricas, em plantas de *Erythrina crista-galli* L., através da avaliação dos danos celulares e da atividade de enzimas antioxidantes e fermentativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições do experimento

Para o desenvolvimento do experimento foram utilizadas plantas de *E. crista-galli* L. obtidas a partir da germinação de sementes coletadas de indivíduos adultos presentes no Campus da Universidade Federal de Pelotas-

Capão do Leão – RS. As sementes foram previamente escarificadas com lixa número 80 no lado posterior ao hilo e desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 5% durante cinco minutos. Em seguida, as mesmas foram semeadas em vasos plásticos de 0,5L contendo substrato comercial (Plantmax) permanecendo por um período de um mês. Sete dias após a emergência iniciou-se a aplicação de 0,2L de solução nutritiva HOAGLAND e ARNON (1938) meia força, pH ajustado para 6,0-6,5, a qual foi repetida a cada dois dias durante todo o período experimental. Após os três meses, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos perfurados, com capacidade de cinco litros, contendo uma mistura de solo e areia lavada (1:1), e desenvolvidas em casa de vegetação por mais três meses, ao final do qual foram então submetidas aos tratamentos.

Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas, onde os vasos foram colocados dentro de vasos plásticos, não perfurados, com capacidade de 10L e com a manutenção de uma lâmina de água, de no mínimo três centímetros acima do solo, durante todo o experimento e plantas não alagadas (controle), irrigadas diariamente. As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30 e 40 dias após a indução dos tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso constituído de dois tratamentos, cinco períodos de avaliação, quatro repetições e duas plantas por repetição. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância através do programa WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

Análises Bioquímicas

O Conteúdo de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Peroxidação Lipídica foram determinados em aproximadamente 500mg de matéria fresca de folhas, raízes principais (raízes laterais de primeira ordem oriundas diretamente da raiz principal) e raízes adventícias. Os tecidos foram macerados em N_2 acrescido de 20% de PVPP e 2mL da solução de extração contendo ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000g, durante 20 minutos e o sobrenadante obtido transferido para *eppendorf* de 2mL.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por CAKMAK; HORST (1991), com algumas modificações. Trezentos microlitros do sobrenadante foram adicionados a 1mL do meio de reação composto por 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (p/v) de TCA sendo posteriormente incubado a 90°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo. As amostras foram centrifugadas novamente a 10000g durante cinco minutos, a 4°C, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento. As leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535nm e 600nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malonodialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em μmol de MDA g^{-1} MF.

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com VELIKOVA et al. (2000), com algumas modificações. Em tubos de ensaio contendo 0,7mL de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e 1mL de KI 1M, foram adicionados 0,3mL do sobrenadante seguido da incubação por 10 minutos a 30°C. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390nm e a concentração de H_2O_2 expressa em μmol de H_2O_2 g^{-1} MF.

Atividade das enzimas antioxidantes:

A atividade das enzimas antioxidantes foi avaliada em folhas, raízes principais e raízes adventícias. O extrato enzimático para a determinação das atividades da superóxido dismutase (**SOD**, EC 1.15.1.1), catalase (**CAT**, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (**APX**, EC 1.11.1.11), foi obtido pela maceração, em nitrogênio líquido, de aproximadamente 500mg de material vegetal acrescido de 20% de PVPP, seguida pela adição de 1,8 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,8), EDTA 0,1mM e ácido ascórbico 20mM. Após centrifugação a 13.000g por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e para a quantificação das proteínas pelo método de BRADFORD (1976).

A atividade da **CAT** foi determinada de acordo com AZEVEDO et al. (1998), com algumas modificações. O extrato enzimático foi adicionado ao meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0) e H_2O_2 12,5mM totalizando um volume final de 3mL. A atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a 240nm durante um período de um minuto e meio, a 28°C e calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $39,4\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$. Os resultados expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da **APX** foi determinada segundo NAKANO; ASADA (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato (ASA) a 290nm. O meio de reação incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5mM e H_2O_2 0,1mM e extrato enzimático. O decréscimo na absorbância foi monitorado por um período de um minuto e meio e a atividade da enzima calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol ASA min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da **SOD** foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de dinitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14mM, NBT 75 μM , EDTA 0,1 μM e riboflavina 2 μM . Os tubos com o meio de reação e a amostra (30 μL) foram submetidos a iluminação com lâmpada fluorescente de 15 W por 10 minutos. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado e, como branco foi utilizado um tubo com meio de reação, com a amostra, mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560nm, sendo uma unidade da SOD correspondente à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

Atividade das enzimas fermentativas:

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade da álcool desidrogenase (**ADH**, EC 1.1.1.1), lactato desidrogenase (**LDH**, EC 1.1.1.27) e piruvato descarboxilase (**PDC**, EC 4.1.1.1) foi obtido através da maceração de 500 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido contendo PVPP (5%), utilizando tampão de extração Tris-HCl (pH 7,5) (6ml) contendo DTT 1mM. Após

homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000g, a 4 °C por 20min. Do sobrenadante centrifugado foi retirada uma alíquota de 2,5mL para dessalinização por cromatografia de exclusão em coluna de sephadex G-25 M (PD-10). As proteínas solúveis foram quantificadas, no mesmo extrato, pelo método de BRADFORD (1976), utilizando soro-albumina bovina (BSA) como padrão.

A atividade da **ADH** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto dessalinizado, tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), NADH 0,2mM e acetaldeído 5mM. A oxidação do NADH foi monitorada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

A atividade da **LDH** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto, tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), NADH 0,2mM, KCN 3µM, metilpirazol 4mM e piruvato de sódio 10mM. A oxidação do NADH foi acompanhada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

A atividade da **PDC** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto, tampão MES-NaOH 50mM - pH 6,5, NADH 0,2mM, MgCl₂ 1mM, TPP 0,5mM, ácido oxâmico 20mM, ADH (10U) e piruvato de sódio 10mM. A reação foi monitorada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

RESULTADOS

Atividade das enzimas antioxidantes:

Os resultados obtidos na avaliação da enzima catalase (**CAT**), nos tecidos foliares não mostrou diferença significativa entre os tratamentos (P=0,65) durante os períodos avaliados (Fig. 1C). No entanto, estatisticamente, foi evidenciado diferença dentro de cada tratamento entre os resultados obtidos a cada período de avaliação (P=0,0046). As plantas alagadas tiveram um acréscimo de 25% na atividade desta enzima aos 30 dias de estresse, em

relação às plantas controle neste mesmo período e de 33% em relação ao primeiro período de avaliação, retomando os valores iniciais nos próximos períodos avaliados (40 e 50 dias). A análise dos resultados para esta variável mostrou interação entre o regime hídrico a que as plantas foram submetidas e o tempo de tratamento ($P=0,05$) (Fig. 1C).

A análise da atividade da ascorbato peroxidase (**APX**) mostrou diferença significativa para os períodos de avaliação ($P=0,0035$) e para os tratamentos ($P=0,0005$), não apresentando, no entanto, interação entre os fatores (Fig. 1B). A atividade desta enzima apresentou valores 60% superiores as plantas controle já no primeiro período de avaliação (10 dias), aumentando até os 30 dias de alagamento com um incremento de 100% em relação às plantas controle neste mesmo período e de 85% quando comparado aos valores do primeiro período avaliado. Entretanto aos 40 dias, ocorreu uma redução na atividade da mesma, alcançando ao final do experimento valores iguais aos observados nas plantas do tratamento controle (Fig. 1B).

A avaliação da atividade da superóxido dismutase (**SOD**) não mostrou diferença significativa entre os tratamentos ($P=0,5$) e entre os períodos avaliados ($P=0,52$). A atividade da SOD foi pouco incrementada pelo alagamento chegando no máximo a 20% de acréscimo aos 30 e 40 dias em relação ao primeiro período avaliado e alcançando valores iguais aos das plantas do tratamento controle ao final da avaliação, demonstrando, desta forma, pouco incremento da atividade desta enzima nos tecidos foliares (Fig. 1A).

Quanto a quantidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas, foi observado diferença significativa entre os tratamentos ($P=0,04$) e entre os períodos avaliados ($P<0,005$), não apresentando, no entanto, interação entre os fatores avaliados (Fig. 2A). Durante todo o tempo de submissão ao estresse as plantas alagadas apresentaram valores superiores aos observados para as plantas controle, sendo que a diferença mais acentuada foi observada aos 10 dias onde o conteúdo de peróxido foi 35% superior nas plantas alagadas em relação as do controle (Fig. 2A).

Na determinação do grau de peroxidação lipídica nas folhas, foi evidenciado um decréscimo durante os períodos avaliados para ambos os tratamentos. No entanto, diferença significativa entre os tratamento ($P<0,005$) e

entre os períodos avaliados ($P=0,001$) foi observada. Plantas submetidas ao alagamento apresentaram maior grau de peroxidação lipídica do que as plantas controle durante todo o experimento, alcançando valores até 65% superiores as plantas controle aos 50 dias de alagamento e valores 25% menores que os obtidos aos 10 dias de tratamento (Fig. 2B).

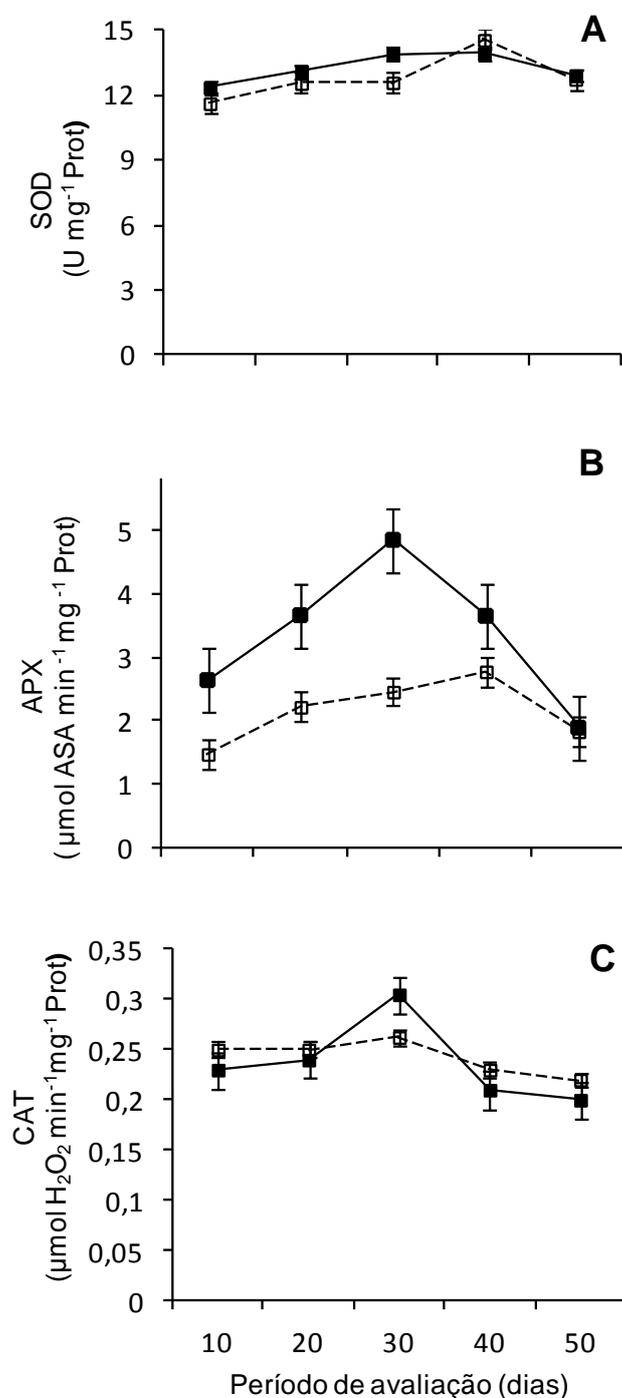


Figura 1. Atividade das enzimas SOD (A), APX (B) e CAT (C) em folhas de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

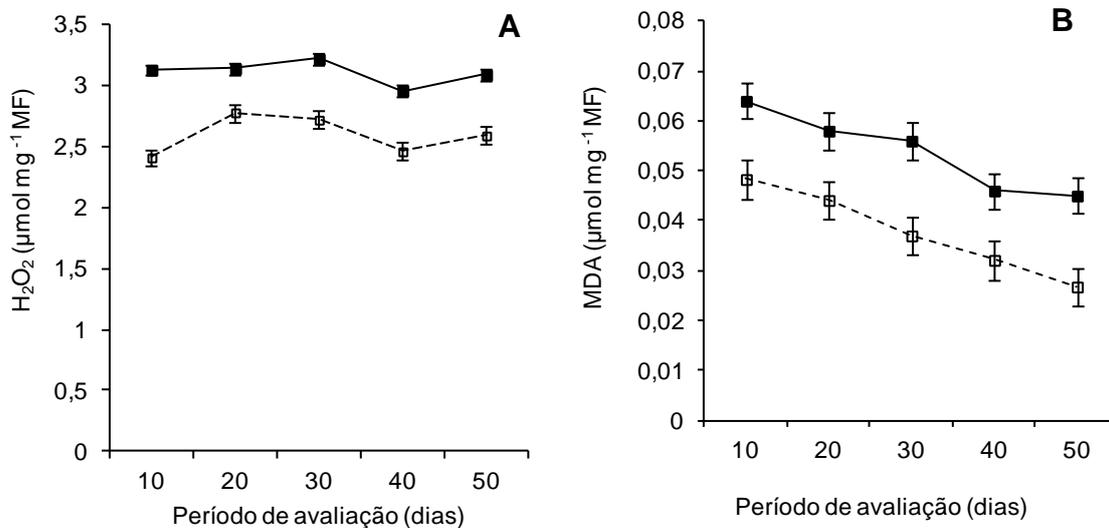


Figura 2. Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) em folhas de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A análise da atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos radiculares, oriundos da raiz principal, demonstrou que a atividade da enzima CAT foi incrementada pela exposição ao alagamento. Os valores obtidos para esta variável mostrou efeito significativo entre os tratamentos ($P < 0,005$) e para o tempo de exposição ao estresse ($P < 0,005$), não demonstrando, no entanto, interação entre estes fatores. O aumento da atividade da CAT foi evidenciado aos 20 dias após a indução do tratamento, com valores 40% maiores que as plantas controle e 55% maiores que a primeira avaliação, chegando a valores máximos de até 70% superiores ao início do alagamento aos 40 dias. Um decréscimo na atividade desta enzima foi evidenciado ao final do experimento (50 dias), chegando a valores próximos aos observados nas plantas controle (Fig. 3C).

A análise da APX mostrou diferença significativa ($P < 0,005$) ao longo dos períodos avaliados. A atividade desta enzima apresentou um incremento de 25%, aos 20 dias, em relação as plantas controle neste período e 74% em relação ao primeiro período avaliado (10 dias), aumentando essa diferença até os 30 dias, com valores 40% superiores as plantas controle. No entanto, aos

40 dias foi observado um decréscimo de 30% em relação ao período anterior (30 dias) alcançando valores inferiores ao controle aos 40 e 50 dias (Fig. 3B).

Na avaliação da enzima SOD foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$) e entre os períodos avaliados ($P < 0,01$) mostrando ainda interação entre estes fatores ($P < 0,001$). Os valores obtidos para esta enzima permitem afirmar que a atividade da SOD foi incrementada nas raízes das plantas alagadas aos 20 e 30 dias de forma a alcançar, neste período valores 80% e 220%, consecutivamente, superiores as plantas não alagadas. Nos últimos períodos avaliados (40 e 50 dias) foi verificado um decréscimo gradual na atividade da SOD. No entanto as avaliações finais evidenciaram ainda valores 70% superiores em relação ao primeiro período avaliado (10 dias) e 35% em relação às plantas controle, neste período (Fig. 3A).

Os resultados obtidos na quantificação do peróxido de hidrogênio livre nas células dos tecidos radiculares mostraram diferença significativa ao longo do período experimental ($P < 0,005$). Os resultados demonstram que níveis de H_2O_2 mais elevados foram encontrados aos 10 dias nas plantas alagadas, em relação às do controle. No entanto, esses valores foram reduzidos em 40% aos 20 dias, mantendo-se estáveis até o final deste experimento. Os valores encontrados evidenciaram uma resposta semelhante nos dois tratamentos, entretanto as plantas do tratamento controle apresentaram valores até 25% menores que as alagadas (Fig. 4A).

A avaliação do grau de peroxidação de lipídios, baseada na formação de MDA, demonstrou diferença significativa entre os períodos avaliados ($P < 0,001$) e a condição hídrica ($P < 0,001$), não mostrando, no entanto, interação entre os fatores avaliados. Os valores de MDA formado nas plantas alagadas foram maiores que nas plantas controle em todos os períodos estudados. Aos 10 dias os valores encontrados nas plantas sob alagamento foram 40% maiores que as do controle. Esses valores foram reduzidos até os 40 dias, mantendo-se até o final do experimento (50 dias). No último período avaliado as plantas alagadas mostram ainda valores 30% menores que as do primeiro período (10 dias) e 55% maiores que as do controle (Fig. 4B).

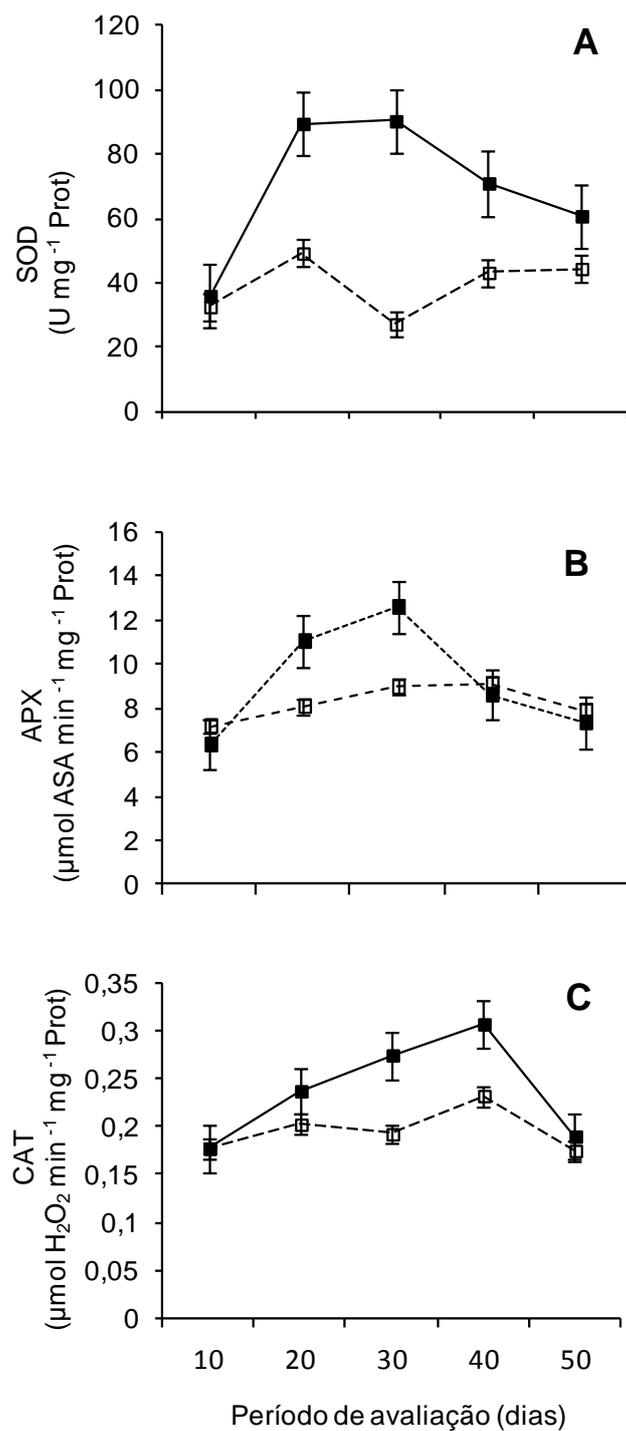


Figura 3. Atividade das enzimas SOD (A), APX (B) e CAT (C) nas raízes principais de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

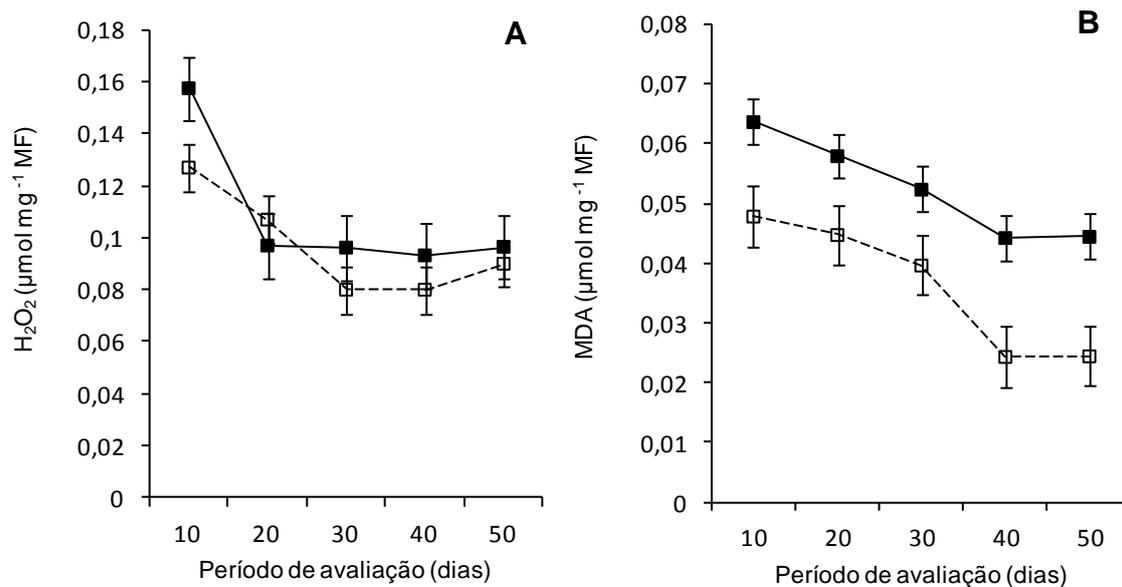


Figura 4. Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) nas raízes principais de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Quando foram comparadas as respostas ao alagamento nas raízes principais em relação às raízes adventícias, foi observado que a CAT mostrou resultados significativamente diferentes nos tempos de alagamento ($P < 0,001$) (Fig. 5C). A atividade da enzima foi crescente dos 20 aos 50 dias, passando neste período a valores 170% maiores. No entanto, os valores obtidos na avaliação da CAT nas raízes adventícias foram sempre muito inferiores aos das raízes principais. Aos 20 dias de alagamento as raízes adventícias apresentavam, para esta enzima, uma atividade 76% menor que as raízes principais e ao final do experimento (50 dias) essa diferença foi reduzida para 10% (Fig. 5C).

A atividade da APX nas raízes adventícias mostrou diferença significativa entre os períodos avaliados ($P < 0,005$), havendo interação entre os fatores avaliados. O aumento crescente da APX nas adventícias atingiu variação de até 260% entre os 20 e 50 dias de alagamento. Os resultados da APX nas raízes principais mostram valores superiores aos das raízes adventícias, variando esta diferença em 380%, 350%, 220% e 15% aos 20, 30, 40 e 50 dias, consecutivamente (Fig. 5B).

A avaliação da SOD mostrou diferença significativa entre os períodos avaliados ($P < 0,001$). A atividade da SOD apresentou resposta semelhante ao das demais enzimas do sistema antioxidante (CAT e APX). Houve um incremento na atividade desta enzima de 320%, entre os 20 e 50 dias de tratamento, nas raízes adventícias. Os valores obtidos nas raízes principais mostraram-se crescentes e maiores que os verificados nas raízes adventícias. Esses valores chegaram a ser 880%, superiores ao das raízes adventícias aos 20 dias, sendo que essa diferença foi reduzida para 55%, aos 50 dias (Fig. 5A).

O grau de peroxidação lipídica (Fig. 6A), assim como a quantidade de peróxido livre nas células das raízes adventícias (Figura 6B) mostram-se muito inferiores aos das raízes principais, mantendo-se baixos durante todo o período experimental.

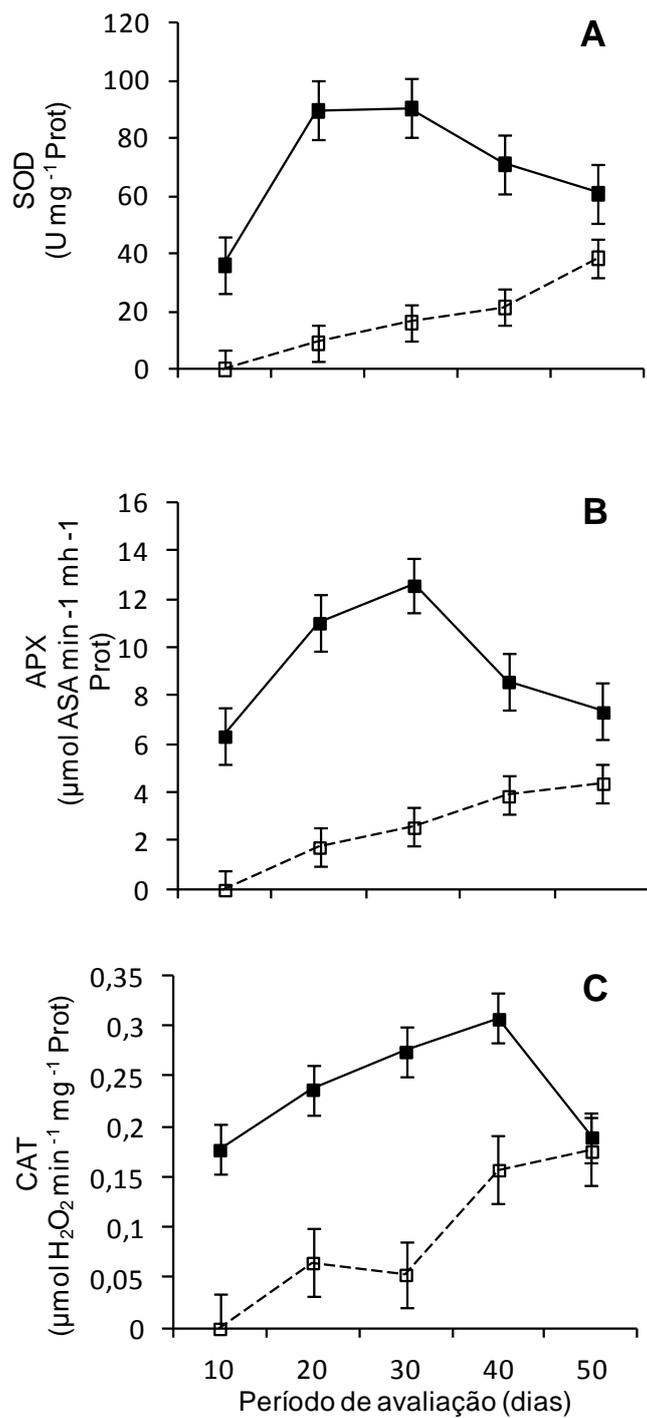


Figura 5. Atividade das enzimas SOD (A), APX (B) e CAT (C) nas raízes principais –E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento. Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

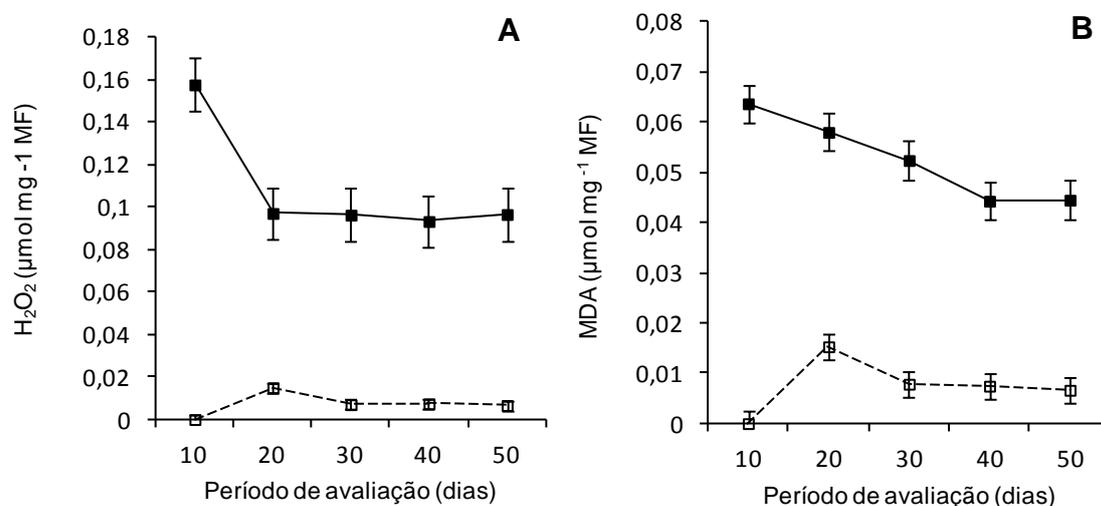


Figura 6. Conteúdo de H₂O₂ (A) e de MDA (B) nas raízes principais - E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento. Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Na avaliação das enzimas fermentativas, foi observado que a atividade da lactato desidrogenase (LDH) nas raízes alagadas foi superior às plantas controle em todos os períodos avaliados, mostrando diferenças significativas entre os períodos de avaliação e entre os tratamentos ($P < 0,05$). No entanto, aos 20 dias a atividade desta enzima foi incrementada em 160% em relação ao primeiro período (10 dias) e 380% em relação às plantas do tratamento controle, sendo reduzida aos 30 dias e mantendo-se até o final do experimento (50 dias) apresentando, nesse período, valores 170% superiores às plantas controle (Fig. 7A). Mesma resposta pode ser observada para a atividade da piruvato descarboxilase (PDC) embora a atividade desta enzima nas raízes alagadas tenha apresentado valores com diferenças mais acentuadas entre os tratamentos, em todos os períodos avaliados, do que as observadas para a LDH. Aos 10 dias foi observada uma atividade 880% maior que as plantas controle, diferença que também foi observada ao final do experimento (Fig. 7B).

A avaliação da atividade da álcool desidrogenase (ADH), evidenciou um aumento crescente na sua atividade ao longo dos períodos avaliados,

mostrando diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,005$) e entre os períodos de avaliação ($P < 0,005$) e interação entre os fatores. Aos 10 dias de tratamento as plantas alagadas apresentaram valores 18 vezes maiores que os observados nas plantas controle, chegando essa diferença máxima aos 40 dias onde as plantas submetidas ao alagamento apresentaram uma atividade da ADH 23 vezes maior que as plantas do tratamento controle. Ao final da pesquisa (50 dias) essa diferença foi reduzida (Fig. 7C).

Quando foi estudada a atividade das enzimas fermentativas nas raízes adventícias, foi verificado para a atividade da LDH (Fig. 8A) diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,0001$), o tempo de alagamento ($P < 0,005$) e interação entre os fatores. Nas raízes principais a atividade foi 17 vezes maior que nas raízes adventícias aos 20 dias. No entanto esta enzima teve um incremento nas raízes adventícias em função do tempo de exposição ao alagamento chegando, ao final do experimento à níveis próximos aos das raízes principais (Fig. 8A).

As enzimas PDC e ADH, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,005$), no entanto não houve diferença ao longo do período experimental nas raízes adventícias. Foi observado que a PDC só foi incrementada aos 40 dias, apresentando valores 140% maiores em relação ao período anterior e aos 50 dias com acréscimo de 300% em relação aos 40 dias (Fig. 8B). No entanto, esses valores foram 65% menores que os observados nas raízes principais. Já a ADH só demonstrou diferença significativa aos 50 dias, com um incremento na sua atividade dez vezes superior ao observado na avaliação anterior (40 dias). Esta enzima, nas raízes principais, apresentou uma atividade 36 vezes maior que nas raízes adventícias aos 50 dias de alagamento (Fig. 8C).

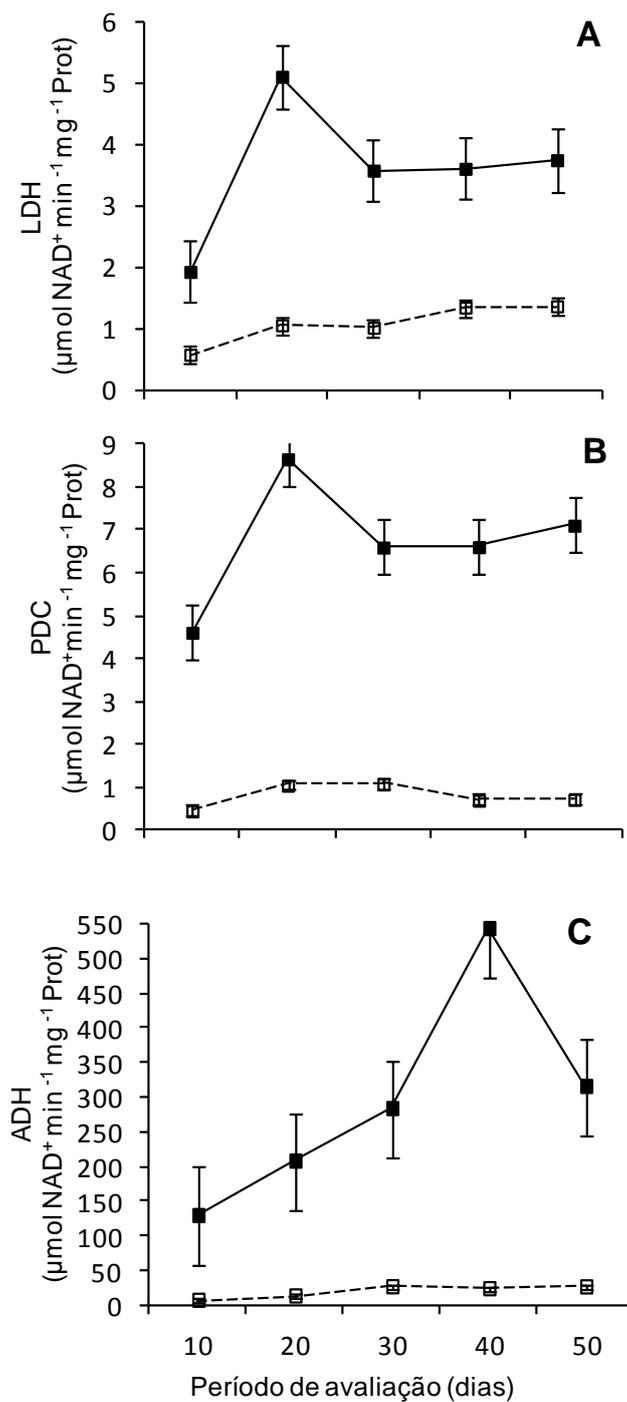


Figura 7. Atividade das enzimas LDH (A), PDC (B) e ADH (C) em raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e em plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

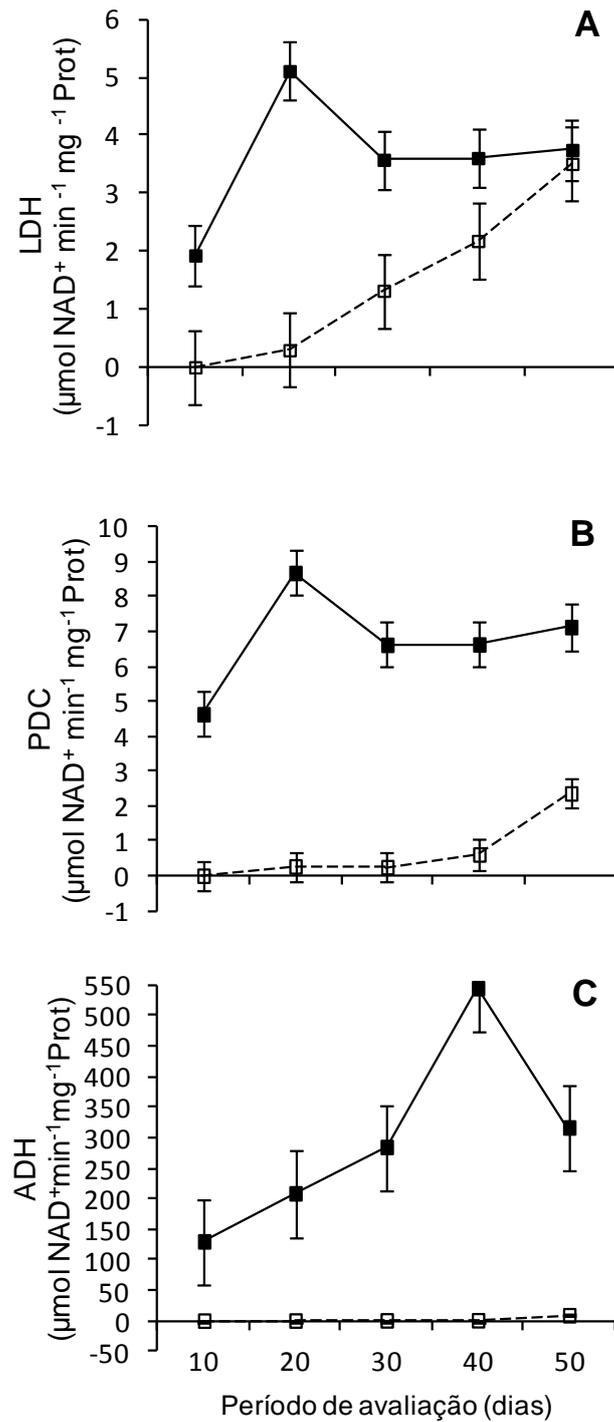


Figura 8. Atividade das enzimas LDH (A), PDC (B) e ADH (C) nas raízes principais-E (■) e nas raízes adventícias-A (□), de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento. Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem-se dado mais atenção aos danos celulares oxidativos causados pela exposição das raízes ao alagamento, condição em que a fosforilação oxidativa é reduzida ou paralisada em razão da deficiência de oxigênio (BLOKINA et al., 2003). O metabolismo aeróbico é um processo oxidativo onde os compostos orgânicos são oxidados e metabólitos intermediários como, por exemplo, o NAD^+ e o FAD, atuam como receptores de elétrons e estes, por sua vez, são re-oxidados nas mitocôndrias para a produção de ATP (DAT et al., 2004). Uma limitação na molécula de O_2 faz com que a adição de elétrons ocorra por meio de reações sequenciais de redução univalente formando os radicais conhecidos como EROs (SCANDALIOS, 2002).

Em plantas, sob condições de hipoxia ou anoxia no solo, ocorre um aumento na produção de EROs como, radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), as quais podem causar danos oxidativos em diferentes partes de plantas (VERMA; DUBEY, 2003). O H_2O_2 , que é a forma protonada do íon peróxido, não é um radical livre, pois não possui qualquer elétron não pareado. No entanto, o H_2O_2 tem uma grande importância nos sistemas biológicos pela facilidade de difusão através da camada bilipídica da membrana celular e por sua capacidade de gerar o radical OH^{\bullet} na presença de metais divalentes (SCANDALIOS, 2002). A reação desses radicais com lipídios é capaz de desencadear uma cascata de reações culminando na peroxidação de lipídios das membranas. Alterações na estrutura e nas funções das membranas, resultante da peroxidação de lipídios, são também caracterizados sob estresse por alagamento e podem resultar em danos ao funcionamento celular (MITTLER et al., 2004). Os mecanismos requeridos é que vão determinar o grau de tolerância de cada espécie a esta condição.

Neste estudo, a atividade da SOD nos tecidos foliares não foi alterada em relação às plantas controle (Fig. 1C). A SOD é considerada a primeira linha de defesa antioxidante, dismutando o $\text{O}_2^{\bullet-}$, formado através do desvio de elétrons para o O_2 molecular, em H_2O_2 e está presente em diversos

compartimentos celulares (MITTLER, 2002). Os resultados encontrados nas folhas sugerem que não houve comprometimento no transporte de elétrons cloroplastídico. Esses resultados podem ser justificados pelos parâmetros de fluorescência transiente da clorofila *a*, onde o transporte de elétrons foi reduzido ao longo do período de alagamento acrescido de um aumento na dissipação da energia luminosa (dados não mostrados). A redução na eficiência fotoquímica pode ter sido utilizada como mecanismo de defesa do aparato fotossintético, evitando o desvio de elétrons para o oxigênio molecular, reduzindo, desta forma, a produção do radical $O^{\bullet-}_2$.

Em contrapartida, houve um aumento da APX e da CAT até os 30 dias de alagamento (Fig. 1 B e C). O aumento da APX justifica a manutenção dos níveis de H_2O_2 como sinalizadores do estresse, já que a APX é uma enzima que tem um K_m baixo pra este substrato, caracterizando uma afinidade maior pelo H_2O_2 do que a CAT. O H_2O_2 , por ser facilmente difundido através das membranas celulares, funciona como molécula sinalizadora em plantas na ativação da expressão de genes relacionados à resposta ao estresse (SCANDALIOS, 2002). Quando os níveis de H_2O_2 ultrapassam a capacidade de detoxificação da APX, eles estimulam a atividade da CAT.

Em *Erythrina speciosa* Andrews, o alagamento promoveu uma redução de até 90% na taxa de assimilação líquida e uma marcante redução na condutância estomática e na transpiração (MEDINA et al., 2009). Resultados similares foram encontrados para *Brachiaria brizantha* sob alagamento (DIAS-FILHO, 2002). Os resultados obtidos na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes em folhas de *E. crista-galli* L. (Fig. 1), em que a atividade da APX e da CAT foi maior aos 30 dias e reduzidas nos períodos seguintes sugerem que houve um aumento no ciclo fotorrespiratório, atribuído ao fechamento estomático, atuando como dreno alternativo do poder redutor gerado pelas reações fotoquímicas. Em plantas C3 a fotorrespiração pode ser uma alternativa para ajudar a consumir parte considerável do fluxo de elétrons quando a disponibilidade de CO_2 nos cloroplastos está limitada (HEBER et al., 1996). No entanto, este processo ocasiona aumento no conteúdo de H_2O_2 nos peroxissomos, fato que pode justificar o incremento na atividade das enzimas CAT e APX neste período (Fig. 1C e B). A redução na atividade destas enzimas nos períodos finais de avaliação coincide com o

restabelecimento do crescimento atribuído à adaptação da espécie ao alagamento, através de outros mecanismos como, por exemplo, a formação das raízes adventícias.

O aumento na atividade da APX coincide com a manutenção da estabilidade nos níveis de H_2O_2 , mesmo que com valores superiores aos encontrados nas plantas controle (Fig. 2A). Com a regulação nos níveis de H_2O_2 é possível verificar um controle no grau de peroxidação lipídica, demonstrando uma eficiente atuação do sistema de defesa antioxidante nas folhas de corticeira do banhado (Fig. 2B).

A atividade das enzimas antioxidantes nas raízes demonstrou uma resposta diferenciada em relação à parte aérea, já que foi o órgão diretamente afetado pela condição hídrica. O aumento na atividade da SOD aos 20 e 30 dias de alagamento é caracterizado pela redução de O_2 molecular nas células das raízes já que este é o aceptor final na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A mitocôndria é extremamente sensível a mudanças nos níveis de O_2 ambiental por ser o principal sítio de consumo de O_2 . Sob hipoxia este processo pode gerar um aumento nas EROs como subproduto do metabolismo respiratório (DAT et al., 2004).

Os resultados da SOD (Fig. 3A), que é a primeira enzima a atuar no sistema de defesa antioxidante enzimático, justificam o aumento da APX e da CAT (Fig. 3B e 3C, consecutivamente) neste mesmo período, já que o aumento na produção do $O_2^{\bullet-}$ ativa a SOD e, desta forma, reflete diretamente no incremento na concentração de H_2O_2 livre exigindo, assim, um estímulo na atividade das enzimas responsáveis pela degradação desta molécula. A capacidade de manter a atividade da SOD, CAT e APX, em níveis elevados, sob condições de estresse ambiental, é essencial para que haja equilíbrio entre a formação e remoção de EROs do ambiente intracelular (MATÉS, 2000).

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana são altamente sensíveis ao ataque do radical hidroxila (OH^{\bullet}). Logo, a peroxidação lipídica mediada, pela ação de radicais livres, pode ser utilizada como indicador da prevalência do estresse oxidativo (KAPPUS, 1985). Neste estudo, a eficiente atuação das enzimas antioxidantes nas raízes evitou o aumento dos níveis de H_2O_2 e, conseqüentemente, na redução da peroxidação de lipídios de membranas, avaliado pela formação de MDA (Fig. 4 A e B).

A partir de 10 dias de tratamento, foi observado, nas plantas alagadas, a formação de raízes adventícias. Nesse período, por estarem ainda pequenas, estas raízes mantiveram-se em contato com a superfície da lâmina de água. Essa condição favoreceu a permeabilidade do oxigênio atmosférico através dos tecidos radiculares, fato esse que justifica a diferença na atividade das enzimas antioxidantes (CAT, APX e SOD) quando foram avaliadas nas raízes principais e nas raízes adventícias (Fig. 5). No entanto, o tempo de exposição ao substrato hipóxico, a que foram submetidas as raízes adventícias, proporcionou uma resposta semelhante à observada nas raízes principais, ou seja, a atividade de todas as enzimas foi incrementada com o tempo de exposição ao estresse. Essa atuação eficiente do sistema antioxidante enzimático nas raízes adventícias foi capaz de controlar a produção de EROs, fato que pode ser evidenciado pelos baixos níveis de H_2O_2 nas raízes adventícias (Figura 6A), limitando desta forma, o aumento na formação de peróxidos lipídicos e evitando, com isso, prejuízos às membranas celulares nestas raízes (Fig. 6B).

As plantas somente conseguem sobreviver à hipoxia ou anoxia do solo caso consigam manter a produção de ATP e reciclagem do poder redutor (MORAES et al, 2001). Alguns autores citados por DREW (1997) associam a adaptação metabólica a aumentos na taxa de fermentação em função de incrementos na atividade das enzimas das vias anaeróbicas, como LDH, PDC e ADH. Estas afirmações vêm ao encontro dos resultados encontrados neste trabalho para *E. crista-galli* L.

Neste estudo a atividade da LDH teve um incremento na sua atividade aos 20 dias e, mesmo decrescendo nos períodos posteriores, ainda manteve-se superior aos valores obtidos nas plantas controle (Fig. 7A). Em *Digitaria suazilandensis*, uma gramínea, o tratamento hipóxico promoveu decréscimo na atividade da LDH em ambos os órgãos (raiz e folha), sem afetar a sobrevivência das plantas (MORAES et al, 2001), sugerindo a tolerância da espécie associada a outros mecanismos.

O controle na queda do pH é promovido pelo balanço entre a produção de lactato e etanol e, conseqüentemente, pelo balanço entre a atividade das enzimas LDH e ADH. A alteração no pH, resultante da acidificação citossólica promovida pela formação do ácido láctico através da atividade da LDH, funciona como um mecanismo de sinalização em plantas sob alagamento (GRANDIS et

al., 2010). O acúmulo de lactato sob baixas concentrações de oxigênio ocorre antes da produção de etanol nas raízes. Esse declínio no pH favorece a atividade catalítica da PDC, que é responsável pela modulação da produção de lactato para etanol, sob hipoxia ou anoxia (GRANDIS et al., 2010), o que justifica os resultados obtidos neste trabalho na avaliação da atividade das enzimas LDH e PDC (Fig. 7A e B).

Em corticeira do banhado, foi observada também uma elevada alteração na atividade da ADH (Fig. 7C), em relação às plantas não alagadas, em níveis crescentes com o tempo de exposição ao déficit de oxigênio, permitindo inferir que esta espécie requer, além de outros mecanismos, a utilização rápida e permanente da rota fermentativa como via alternativa para manutenção do metabolismo, regeneração de poder redutor e produção de ATP, quando submetida ao excesso de água nas raízes.

A avaliação da atividade das enzimas fermentativas nas raízes adventícias (Fig. 8) demonstrou uma resposta semelhante a que foi encontrada para as enzimas antioxidantes. Nas raízes adventícias, a utilização da rota fermentativa foi requerida aos poucos, em função do tempo de exposição, sugerindo que o tempo e o grau de submersão destas raízes tenham influenciado diretamente na necessidade de aumentar a atividade das enzimas fermentativas como forma de suportar, juntamente com as raízes principais, o estresse ocasionado pelo alagamento e conseguir manter a produção de ATP e o metabolismo da planta. Provavelmente, a formação das raízes adventícias e a utilização da rota fermentativa nas mesmas tenham contribuído para a redução da atividade destas enzimas nas raízes principais nos períodos finais de avaliação.

Altos níveis na atividade da ADH tem sido associado com a tolerância ao alagamento em plantas (LIAO; LIN, 2001). Em *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv., sob alagamento, a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo anaeróbico aumentou de 1,5 a 30 vezes, comparada a atividade das plantas em condições aeróbicas (FUKAO et al., 2003). Em *Euterpe oleracea* Mart. a atividade da ADH foi incrementada após dois dias de alagamento, total ou parcial (GONÇALVES et al., 2010).

Para espécies tolerantes a inundações, não existem evidências na literatura de que a atividade da LDH e da ADH seja limitante para a

sobrevivência destas plantas sob hipoxia ou anoxia, no entanto, estudando alterações nos padrões da expressão gênica em plantas de *Arabidopsis* sob alagamento, KLOK e colaboradores (2002) definiram algumas classes de genes mais afetados por esta condição, entre elas os genes envolvidos no metabolismo do etanol, o que poderia caracterizar uma condição pré-adaptativa, pois proporciona uma condição de continuidade da produção de ATP (VISSER; VOESENEK, 2004).

CONCLUSÕES

O alagamento, durante o período estudado, não compromete as plantas de *Erythrina crista-galli* L., visto que estas são capazes de acionar, rapidamente, o sistema de defesa antioxidante enzimático, reduzindo assim os danos oxidativos. Da mesma forma, a espécie é hábil em utilizar a rota fermentativa como alternativa para a manutenção da produção de energia durante a condição hipóxica. A formação das raízes adventícias é a estratégia morfológica mais evidente para a sobrevivência das plantas sob alagamento, permitindo que através das mesmas ocorra um ajustamento metabólico lento e contínuo, durante todo o período de estresse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em corticeira-do-banhado (*Erythrina crista-galli* L.), submetida à redução na disponibilidade de oxigênio, o investimento inicial na formação de estruturas morfo-anatômicas oferece à planta um suporte para os ajustamentos metabólicos necessários para voltar a investir no crescimento da parte aérea, limitado pelo alagamento nos períodos iniciais do estresse. Assim, a formação das raízes adventícias mostrou-se como a estratégia morfológica mais evidente para a sobrevivência das plantas sob alagamento, permitindo que através das mesmas ocorra um ajustamento lento e contínuo, durante todo o período de estresse. Em tecidos foliares a análise da fluorescência da clorofila a demonstrou que a corticeira-do-banhado utiliza a dissipação de energia como forma de evitar danos ao aparato fotossintético e reduzindo também, a formação excessiva de radicais livres nos cloroplastos. O alagamento promove alterações na produção de EROs, em tecidos foliares e radiculares, no entanto ocorre um ajustamento rápido devido à capacidade de detoxificação pela atividade eficiente do sistema de defesa antioxidante enzimático, evitando danos estruturais às membranas celulares ocasionados pelo estresse oxidativo. A rota fermentativa é utilizada rapidamente pela espécie estudada para manter a produção de ATP em condição de hipoxia no substrato. Desta forma, a partir de conhecimentos adquiridos, sugere-se a importância de desenvolver outras pesquisas que envolvam a corticeira, levando em consideração estudos que envolvam a atividade fotossintética, a utilização de carboidratos pelas raízes e a absorção, transporte e metabolismo de nitrogênio em condições de alagamento, já que esta espécie apresenta fixação biológica

de N_2 . Ainda, considera-se interessante descrever alterações ultraestruturais desenvolvidas em decorrência da baixa disponibilidade de O_2 .

REFERÊNCIAS

- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v.104, p. 280-292, 1998.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul** : guia de identificação & interesse ecológico – as principais espécies nativas sul-brasileiras. Instituto Souza Cruz, Rio de Janeiro, 2002, 322p.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L.A.C.J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.313–339, 2008.
- BATISTA, C.U.N.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C.; PIMENTA, J.A. Tolerância à inundação de *Cecropiapachystachya* Trec. (Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. **Acta Botânica Brasileira**, v.22, p.91-98, 2008.
- BIANCHINI, E; MEDRI, M.E.; PIMENTA, J.A.; GILONI, P.C.; KLOBI, R.M.; CORREA, G.T. Anatomical alterations in plants of *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. submitted to flooding. **Interciencia**, Caracas, v. 25, n. 9, p. 436-441, 2000.
- BLOKINA, O.; VIROLAINEM, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 9, p. 179-194. 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.48-254, 1976.
- BRANDÃO, M. **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Epamig, 2002, 528p.

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

CASSOL, D.; SILVA, F.S.P.; FALQUETO, A.R.; BACARIN, M.A.; An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, v. 46, p. 634-636, 2008.

CARPANEZZI, A.A.; TAVARES, F.R.; SOUZA, V.A. **Estaquia de Corticeira do Banhado (*Erythrina crista-gali* L.)**. Comunicado Técnico 64. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - EMBRAPA, Colombo- PR, nov. 2001.

CARVALHO, P.E.R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; **Embrapa Florestas**, v.2. 1036p. 2003.

COSTA, R.A.V.C; MORAIS, A.B.B. Fenologia e visitantes florais de *Erythrina crista-galli* L. (Leguminosae:Faboideae) em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 2, jun. 2008.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 2, 1984.

CRONQUIST, A. Na Integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, p.598-601. 1981.

DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P.M. Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 273-282, 2004.

DAVANSO, V.M.; SOUZA, L.A.; MEDRI, M.E.; PIMENTA, J.A.; BIANCHINI, E. Photosynthesis, growth and development of *Tabebuia avellanedae* L. ex Griseb. (Bignoniaceae) in flooded soil. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v.45, p.375-384, 2002.

DIAS-FILHO, M.B. Tolerance to flooding in five *Brachiaria brizantha* accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.4, p. 439-447, 2002.

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

EZIN, V.; PENA, R.L.; A, A. Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 131-142, 2010.

FARRAR, J.F.; JONES, D.L. The control of carbon acquisition by roots. **New Phytologist**, v. 147, p. 43-53, 2000.

FERREIRA, J.N.; RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L. Crescimento inicial de *Piptadenia gonoacantha* (Leguminosae, Mimosoideae) sob inundação em

diferentes níveis de luminosidade. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n.4, p. 561-566, 2001.

FIGLIOLIA, M.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M. Manejo de sementes de espécies florestais. **IF Série Registros**, São Paulo, n. 15, p. 1-59, 1995.

FUKAO, T., KENNEDY, R.A., YAMASUE, Y.; RUMPHO, M.E. Genetic and biochemical analysis of anaerobically-induced enzymes during seed germination of *Echinochloa crus-galli* varieties tolerant and intolerant of anoxia. **Journal of Experimental Botany**, v.386, p.1421-1429, 2003.

GONÇALVES, J.F.C.; LIMA, R.B.S.; FERNANDES, A.V.; BORGES, E.E.L.; BUCKERIDGE, M.S. Physiological and biochemical characterization of the assai palm (*Euterpe oleracea* mart.) during seed germination and seedling growth under aerobic and anaerobic conditions. **Revista Árvore**, v.34, n.6, p.1045-1053, 2010.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

GRANDIS, A.; GODOI, S.; BUCKERIDGE, M.S. Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas à mudanças climáticas globais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.1, p.1-12, 2010.

GRATIERI-SOSSELLA, A.; PETRY, C.; NIENOW, A.A. Propagação de corticeira do banhado (*Erythrina crista-galli* L.) (FABACEAE) pelo processo de estaquia. **Revista Árvore**, v.32, n.1, 2008.

HEBER, U.; BLIGNY, R.; STREB, P.; DOUCE, R. Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C3 plants against photoinactivation under sunlight. **Botanical Acta**, v.109, p.307-315, 1996.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**. California Agricultural Experimental Station, 1938, circ.347, p.1-39.

ISHIDA, F.; OLIVEIRA, L.E.M.; CARVALHO, C.J.R.; ALVES, J.D. Efeitos da inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência e agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1152-1159, 2002.

JOLY, A.B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Editora Nacional. p. 372-379, 1998.

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: Sies H (ed), **Oxidative stress**, Academic Press, London, 1985, p.273-310.

KLOK, E.J.; WILSON, I.W.; WILSON, D.; CHAPMAN, S.C.; EWING, R.M.; SOMERVILLE, S.C.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Expression profile

analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **Plant Cell**, v. 14, p. 2481-2494, 2002.

KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, v. 1, p. 1-29, 1997.

LAGE-PINTO, F.; OLIVEIRA, J.G.; DA CUNHA, M.; SOUZA, C.M.M.; REZENDE, C.E.; AZEVEDO, R.A. Chlorophyll a fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.64 p.307-313, 2008.

LIAO, C.T., LIN C.H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proclamation National Science Council**, v.3, p.148-157, 2001.

LONGHI, R. **Livro das Árvores: árvores e arvoretas do Sul**. Porto Alegre: L & PM, 1995, 174p

LOPEZ, O.R.; KURSAR, T.A. Does flood tolerance explain tree species distribution in tropical seasonally flooded habitats? **Oecologia**, v. 136, p. 193-204, 2003.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. São Paulo: Editora Plantarum LTDA. 1992. 203p.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. v. 1. São Paulo: Plantarum, 2008.

LUO, F.L.; NAGELI, K.A.; SCHARRI, H.; ZENG, B.; SCHURRI, U.; MATSUBARA, S. Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after de-submergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. **Annals of Botany**, v. 107, p. 49-63, 2011.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat – Sistema de Análise Estatística para Windows versão 1.0 – Universidade Federal de Pelotas**, 2007.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.

MAUCHAMP, A.; MÉTHY, M. Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *Phragmites australis*. **Environmental and Experimental Botany** v.51,n.3,p.227-235-jun. 2004.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence a practical guide. **Journal Experimental Botanic**, n.51, p.659-668, 2000.

MEDINA, C.L.; SANCHES, M.C.; TUCCI, M.L.S.; SOUZA, C.A.F; CUZZUOL, G. R.F.; JOLY, C.A. *Erythrina speciosa* (Leguminosae-Papilionoideae) under soil water saturation: morphophysiological and growth responses **Annals of Botany**, v. 104, p. 671-680, 2009.

MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; DELGADO, M.F.; CORREA, G.T. Aspectos morfofisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. submetida ao alagamento **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.3, p.261-267, 1998.

MEDRI, M.E.; FERREIRA, A.C.; KOLB, R.M.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; DAVANSO-FABRO, V.M.; MEDRI, C. Alterações morfoanatômicas em plantas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. submetidas ao alagamento **Acta Scientiarum -BiologicalSciences**, v.29, n.1, p.15-22, 2007.

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

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v.9, p.490-498. 2004.

MORAES, M.G.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M.; VITORINO, P.F.P.G.; MAGALHÃES, M.M. Caracterização do crescimento e da atividade das desidrogenases alcoólica e láctica em seis espécies herbáceas sob condição de hipoxia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.86-95, 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**, v.164, n.4, p.394-407, 2007.

NAGEL K.A; SCHURR, U.; WALTER, A. Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. **Plant, Cell & Environment**, v.29, p.1936-1945, 2006.

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

NEILL, D.A. Interspecific hybridization in *Erythrina* : a homogamic complex. In: Westley, S.B.; Powell, M.H. ed. **Erythrina in the New and Old Worlds**. Paia: Nitrogen Fixing Tree Association, p.250-257, 1993.

PANDA, D.; RAO, D.N.; SHARMA, S.G.; STRASSER, R.J.; SARKAR, R.K. Submergence effects on Rice genotypes during stage: probing of submergence drives changes of photosystem 2 by chlorophyll a fluorescence induction O-J-I-P transients. **Photosynthetica**, v.44, n.1, p.69-75, 2006.

PAROLIN, P. Phenology and CO₂-assimilation of trees in Central Amazonian Floodplains. **Journal of Tropical Ecology**, v.16, p.465-473, 2000.

PAZ, E.A.; BASSAGODA, N.J. Aspectos Fitogeográficos y diversidad biológica de las formaciones boscosas Del Uruguay. **Ciência & Ambiente**, n. 24. Santa Maria: Editora Pallotti. p.35-50, 2002.

PIMENTA, J.A.; MEDRI, E.A.; BIANCHINI, E.; MULLER, C. Aspecto da morfoanatomia e fisiologia de *Jacaranda puberula* Cham. (Bignoniaceae) em condições de hipoxia. **Revista Brasileira de Botânica**, v.19, n.2, p.215-220, 1996.

PISICCHIO, C.M., BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; SERT, M.A.; DEVANSO-FABRO, V.M.; MEDRI, M.E. *Heliocarpus popayanensis* (Malvaceae) tolera a hipoxia do substrato? **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v.32, n.2, p.201-209, 2010.

POVH, J.A.; RUBIN, FILHO C.J.; MOURÃO, K.S.M.; PINTO, D.D. Respostas morfológicas e anatômicas de plantas jovens de *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. (Bombacaceae) sob condições de alagamento. **Acta Scientiarum –Biological Sciences**, v.27, n.3, p.195-202, 2005.

RAGUSA-NETO, J. Exploitation of *Erythrina dominguezii* Hassl. (Fabaceae) néctar by perching birds in a dry Forest in western Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v.62, n.4 b, 2002.

REGINFO, E.; TEZARA, W.; HERRERA, A. Effect of flooding and drought on chlorophyll *a* fluorescence on trees of a tropical seasonally flooded forest, p.288-291. *In: I. Quentin (ed.). The tree 2000*, Montreal. 2001.

REITZ, P; KLEIN, R.M; REIS, A. **Projeto Madeira de Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: H.B.R., SUDESUL, DRNR, 1988, 525 p.

RODERJAN, C.V.; GALVAO, F.; KUNYOSHI, Y.S.; HATSCHBACH. C.C. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, **Ciência & Ambiente**, n.24. Santa Maria: Editora Pallotti. p.75-92, 2002.

RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. 2.ed. São Paulo: Edusp:Fapesp. 2001. 320p.

RODRIGUES, P.R.F. **Estudo de um fragmento florestal do Horto Municipal da Barragem do Arroio Santa Bárbara no município de Pelotas-RS**, Dissertação de Mestrado – UFPel, 2007.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v.40, p.13-29. 2002.

SANTOS, N.R.Z; TEIXEIRA, I.F. **Arborização de vias públicas: Ambiente x vegetação**. 1. ed. Santa Maria: Editora Pallotti. 135p, 2001.

SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Science**, v.27, n. 9, p.483-486, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular Perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014, 2005.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, p.35-52, 2005.

SILVA, A.J.C.; CARPANEZZI, A.A.; LAVORANTI, O.J. Quebra de dormência de sementes de *Erythrina crista-galli* L. **Boletim de pesquisas Florestais**. Embrapa Florestas, n.53, p.65-78, 2006.

SLEWINSKI, T.L., BRAUN, D.M. Current perspective on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. **Plant Science**, v.178, p.341–349, 2010.

SOUZA, C.A.F.; SODEK, L. Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, n.1, p.1-8, 2003.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.), **Photosynthesis: from light to biosphere**, Kluwer Academic publisher:Dordrecht, The Netherlands, p.977-980, 1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE. Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v.61, p.32-42, 1995.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE, (Eds.), **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, 2004, p.321-362.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. **Plant Science**, v.151, p.59-66, 2000.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v.164, p.645-655, 2003.

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

YUSUF, M.A.; KUMAR, D; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll *a* fluorescence measurements **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

WAECHTER, J.L. Padrões geográficos na flora atual do Rio Grande do Sul. **Ciência & Ambiente**, v.24, p.93-108, 2002.