



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

GLAYCIANNE CHRISTINE VIEIRA DOS SANTOS

**RELAÇÃO DO NITROGÊNIO COM A TOLERÂNCIA À HIPOXIA EM
CLONES DE EUCALIPTO**

Prof^ª. Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL

GLAYCIANNE CHRISTINE VIEIRA DOS SANTOS

**RELAÇÃO DO NITROGÊNIO COM A TOLERÂNCIA À HIPOXIA EM CLONES DE
EUCALIPTO**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito parcial para a obtenção do Título de Engenharia Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Prof^ª. Dra. EVÂNIA GALVÃO MENDONÇA
Orientadora

SEROPÉDICA, RJ
NOVEMBRO – 2014

**RELAÇÃO DO NITROGÊNIO COM A TOLERÂNCIA À HIPOXIA EM
CLONES DE EUCALIPTO**

GLAYCIANNE CHRISTINE VIEIRA DOS SANTOS

Monografia aprovada em 19 de novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Evânia Galvão Mendonça
UFRRJ/IF/DS
Orientadora

Prof. Dr. Rogério Luiz da Silva
UFRRJ/IF/DS
Membro

Prof. Dr. Mauricio Ballesteiro Pereira
UFRRJ/IB/DG
Membro

DEDICATÓRIA

À minha família, aos meus amigos
e à todas as pessoas que de alguma forma
foram fundamentais para a realização deste trabalho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me possibilitado presenciar verdadeiros milagres ao longo desses cinco anos de graduação;

À minha família que sempre me apoiou e incentivou em todas as minhas decisões. Certamente não conseguiria cruzar este longo caminho sem a existência dessas cinco pessoas (e mais recentemente seis) em minha vida. Agradeço à minha mãe Selene, pela amizade e pelos conselhos sempre necessários e oportunos, pela fibra que demonstra e por ser meu grande exemplo de mulher e guerreira. Agradeço à meu pai Gleison, por me ensinar a importância de se ter disciplina, por estar presente mesmo em sua ausência e por sempre ter me incentivado a me qualificar e buscar o meu melhor. Às minhas irmãs Glaycilene, Danielle e Gabrielle por estarem sempre ao meu lado, mesmo com todas as brigas e desentendimentos normais entre pessoas que se amam, e por aguentarem meus momentos de estresse “pré-provas”. Ao mais novo membro da família, Arthurzinho, por ter me transformado nessa tia babona e por ter iluminado a vida de todos com seus sorrisos e caretas. Amo muito todos vocês!

Dizem que amigos são anjos enviados por Deus para tornar nossos dias mais abençoados e nos fazer passar pelas dificuldades mais facilmente. Se isso for verdade, fui abençoada com muitos anjinhos, em especial duas amigas-irmãs tão diferentes entre si que se completam, me completando “por tabela”. Nosso trio resistiu à todas as turbulências da vida e tenho certeza que é uma amizade eterna. Agradeço à Thais e Camila por fazer dos meus dias mais alegres, pelas madrugadas de estudos (e as de festa também), pelos conselhos e puxões de orelha. Não tenho como prever os caminhos por onde a vida irá me levar mas saibam que sempre as carregarei comigo. Amo vocês!

Agradeço às meninas mais lindas do quarto mais legal do F1 (27-A): Clara, Jéssica e Micaela, por terem me acolhido com tão boa vontade e por me fazerem sentir parte de uma família. Clarinha com seus ótimos conselhos e gosto musical, Jéssica com suas crises de desespero com as provas e lapsos de memória que sempre nos fazem rir e Micaela com seu riso fácil e simpatia que contagiam a todos. Aprendi a amar cada uma de vocês e sentirei muitas saudades;

À turma 2010-I de Engenharia Florestal, pelos excelentes momentos de descontração e estudos compartilhados, pela amizade e afeto indispensáveis nesses anos de graduação;

À grande equipe da Flora Jr., em especial “meus meninos” do marketing: João e Aloísio, pela troca de experiências, pelas longas horas de trabalho e pelos momentos de diversão. Aprendi muito com vocês! Obrigada por me deixarem fazer parte desta família;

Aos colegas do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal (LGMV) pelo auxílio em minhas pesquisas e pela companhia no dia a dia e em congressos;

Ao professor Valdir Diola (*in memoriam*) por ter acreditado na minha capacidade mesmo quando nem eu acreditei, pela amizade e orientação sempre nas medidas certas e por ter me introduzido no meio acadêmico me incentivando a sempre almejar mais alto. Ele costumava dizer “nós vamos chegar longe!”, hoje infelizmente esse “nós” não existe mais e tampouco posso afirmar que atingirei esse “longe”, mas

com certeza aonde quer que eu chegue foi porque no início existiu um “nós”. Obrigado meu orientador e amigo!

À professora Evânia Mendonça que, com toda a paciência do mundo, tornou possível que a presente monografia se construísse;

Ao professor Rogério da Silva por ter me estendido as mãos quando eu precisei de orientação e por ter me apresentado à professora Evânia;

Ao professor Maurício Ballesteiro, pelo auxílio estatístico e pelos conselhos acadêmicos valiosíssimos!

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me proporcionar verdadeiras belezas cênicas nesse campus enorme!

À todos os supracitados meus mais sinceros agradecimentos!

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) e a concentração de nitrato antes e após o tratamento hipóxico em raízes e folhas de dois clones tolerante (2719) e sensível (1213) de híbridos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Foram coletadas raízes e folhas de ambos os clones e estas foram mantidas submersas em água ultrapura por 3h, simulando situação hipóxica. As repetições foram compostas por 3 amostras de cada tecido vegetal tanto para o tratamento hipóxico como para o controle, totalizando 24 amostras. A partir de então, realizaram-se as determinações da atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) e da concentração de nitrato endógeno nas raízes e folhas de ambos os genótipos. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas através do teste F à nível de 5% de significância. Observou-se uma predominância da atividade da RN em raízes do clone 2719 e, conseqüentemente, redução na concentração de nitrato neste tecido. Em folhas deste clone observou-se um aumento na atividade enzimática sob condições de hipoxia, indicando que este genótipo apresenta uma maior resposta adaptativa em situações de estresse. O clone 1213 não apresentou alterações significativas na atividade enzimática em tratamento hipóxico, mantendo os mesmos níveis de nitrato tanto em raízes quanto em folhas. Comparando ambos os genótipos, o clone 2719 apresentou uma maior atividade enzimática nas raízes mesmo em condição de hipoxia, indicando que tal clone é mais eficiente na redução do nitrato.

Palavras-chave: estresse, nitrato, atividade enzimática, eucalipto urograndis.

ABSTRACT

The present study was aimed to evaluate the activity of the enzyme Nitrate Reductase (NR) and the concentration of nitrate before and after a hypoxic treatment in leaves and roots of tolerant clone (2719) and sensitive clone (1213) of hybrids of *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Roots and leaves of both clones were collected and then kept submerged in ultrapure water for 3 hours, simulating hypoxic situation. The replicates were composed of 3 samples of each plant's tissue for both hypoxic treatment and control treatment, totalling 24 samples. Then, the activity of the enzyme reductase (NR) and the concentration of endogenous nitrate in the roots and leaves of both genotypes were determined. The obtained data was subjected to analysis of the variance (ANOVA) and the means were compared using the F test at 5% of significance. The results showed the predominance of NR activity in the roots of clone 2719 and the consequently decrease of nitrate concentration in the tissue. The leaves of this clone showed an increase in the enzymatic activity under hypoxic conditions, indicating that this genotype has a greater adaptive response in a situation of stress. The clone 1213 did not show significant alteration in the enzyme activity in the hypoxic treatment, maintaining the same levels of nitrate in both the roots and sheets. Comparing both genotypes, clone 2719 showed a higher enzyme activity in the roots even in hypoxic condition, indicating that this clone is more effective in reducing nitrate.

Keywords: stress, nitrate, enzyme activity, eucalipto urograndis.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
2.1. Eucalipto	1
2.2. Estresse Abiótico	2
2.3. Hipoxia.....	3
2.4. Metabolismo Respiratório das Plantas sob Hipoxia	5
2.5. Metabolismo do Nitrogênio	8
2.6. Atividade Enzimática.....	9
3. OBJETIVO	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Condição Experimental e Caracterização dos Clones	10
4.2. Atividade da Redutase do Nitrato	10
4.3. Quantificação da Concentração de Nitrato	11
4.4. Análise Estatística.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
5.1. Atividade da Redutase do Nitrato e Quantificação da Concentração de Nitrato	12
6. CONCLUSÃO.....	14
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática da Redutase do Nitrato ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF} \cdot \text{h}^{-1}$) e da concentração de nitrato ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$) em raízes dos clones 2719 (tolerante) e 1213 (sensível) de *Eucalyptus urograndis*, submetidas à hipoxia.
..... 12

Tabela 2. Atividade enzimática da Redutase do Nitrato ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF} \cdot \text{h}^{-1}$) e da concentração de nitrato ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas dos clones 2719 (tolerante) e 1213 (sensível) de *Eucalyptus urograndis*, submetidas à hipoxia.
..... 12

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aclimações metabólicas após redução nos níveis de O_2 . As plantas apresentam múltiplas rotas para o catabolismo da sacarose, produção de ATP, e regeneração de NAD^+ e $NAD(P)^+$. As setas azuis indicam as reações que são promovidas durante o estresse..... 6
- Figura 2.** Curva padrão de nitrito em concentrações variando de 0 a 500 nM de NO_2^- .
..... 11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-OGDH	2-Oxiglutarato Desidrogenase
ADH	Álcool Desidrogenase
ADP	Adenosina Difosfato
AlaAT	Alanina AminoTransferase
ALDH	Acetaldeído Desidrogenase
ATP	Adenosina Trifosfato
AspAT	Aspartato Aminotransferase
CoASH	Coenzima A
CS	Citrato Sintase
ETC	Cadeia Transportadora de Elétrons
FAD+	Dinucleótido de Flavina e Adenina Oxidado
FADH₂	Dinucleótido de Flavina e Adenina
FK	Frutoquinase
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GDC	Glutamato Descarboxilase
GDH	Glutamato Desidrogenase
GHBDH	γ -Aminobutirase Desidrogenase
GOGAT	Glutamina Oxoglutarato Aminotransferase
GS	Glutamina Sintase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HXK	Hexoquinase
ICDH	Isocitrato Desidrogenase
INV	Sacarose Invertase Unidirecional
LDH	Lactato Desidrogenase
LOES	Low Oxygen Escape Syndrome
LOQS	Low Oxygen Quiescence Syndrome
MDH	Malato Desidrogenase
N	Nitrogênio
NAD+	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Oxidado
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina Reduzido
NDP	Nucleosídeo Difosfato quinase
NH₄⁺	Amônio
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Ânion Superóxido
OH	Radical de Hidroxila
PCK	Fosfoenolpiruvato Carboxilase Quinase
PDC	Piruvato Descarboxilase
PDH	Piruvato Desidrogenase
PEPC	Fosfoenolpiruvato Carboxilase
PFK	Fosfofrutoquinase
PK	Piruvato quinase

PPi	Pirofosfato Inorgânico
PPDK	Piruvato Fosfato Diquinase
RN	Redutase do Nitrato
RNi	Redutase do Nitrito
ROS	Reactive Oxygen Species
SDH	Succinato Desidrogenase
SSADH	Succinato Semialdeído Desidrogenase
SUS	Sacarose Sintase Bidirecional UDP-Dependente
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
UDP	Uridina Difosfato
UTP	Uridina Trifosfato

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a área plantada com espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil ocupa 76,6% da área total com plantios florestais de Pinus e Eucalipto (cerca de 7 milhões de hectares) (ABRAF, 2013). A elevada representatividade dessas espécies se deve ao seu rápido crescimento associado à curta rotação e alta produtividade das mesmas (ABRAF, 2010). Buscando um aumento na produtividade do setor florestal, pesquisas têm sido realizadas visando a seleção de material genético mais adaptado às diversas condições ambientais que são frequentemente consideradas desfavoráveis ao pleno desenvolvimento das plantas (CAMBRAIA, 2005).

Apesar das espécies de eucaliptos, de um modo geral, serem conhecidas por sua capacidade de adaptação às diversas regiões ecológicas, quando cultivadas em solos mais adensados e sujeitos à redução na disponibilidade de oxigênio, têm se observado perdas expressivas na produção, uma vez que o crescimento de tais espécies é afetado nessas condições (CURI, 2000).

A redução de oxigênio abaixo dos níveis que mantenham o metabolismo em níveis normais compromete o crescimento as plantas e é a forma mais comum de estresse em solos úmidos (SAIRAM et al., 2008). Sob condições naturais ou experimentais, as plantas podem estar expostas a diferentes concentrações de oxigênio (O₂) no solo, variando desde níveis normais (normoxia), passando por uma redução significativa (hipoxia), chegando até a total ausência (anoxia) (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

Existem espécies que são afetadas de forma moderada pela falta ou deficiência de oxigênio sendo, portanto, consideradas tolerantes a essas condições. As espécies tolerantes podem suportar temporariamente condições de anoxia e/ou hipoxia, apresentando mecanismos físicos e metabólicos que conferem tal comportamento em situações de estresse (OLIVEIRA, 2004). Dentre esses mecanismos, o metabolismo do nitrogênio tem se destacado auxiliando na aclimatação celular de plantas sob esse tipo de estresse (BAILEY-SERRES et al. 2012). O suprimento de nitrato, em condições de hipoxia, gera uma melhora no estado REDOX (relação NADH/NAD⁺) elevando a carga energética através do consumo de poder redutor (NADH) gerados pela glicólise e consumo de prótons pela redução do nitrato à nitrito (STOIMENOVA et al., 2003), podendo servir como alternativa ao metabolismo fermentativo (ROBERTS et al., 1985).

Entender o funcionamento de tal mecanismo é de suma importância para o desenvolvimento de programas de melhoramento que viabilizem a seleção precoce de clones tolerantes, possibilitando seu cultivo em áreas sujeitas a inundação.

Com isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) e a concentração de nitrato antes e após o tratamento hipóxico em raízes e folhas de dois clones de eucalipto

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, tem sua origem na Austrália. É dividido em 8 subgêneros: *Blakella*, *Eudesmia*, *Gaubaea*, *Idiogenes*, *Telocalyptus*, *Monocalyptus*, *Symphyomyrtus* e *Corymbia* (hoje considerado gênero).

No Brasil, as principais espécies plantadas são o *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, híbridos de *E. grandis* X *E. urophylla*, *E. citriodora* e *E. camaldulensis* (IPEF 2014).

Geralmente, a hibridação entre espécies de diferentes subgêneros não ocorre, sendo mais comum entre espécies de um mesmo subgênero (GRIFFIN et al., 1988). Entre os exemplos de sucesso da hibridação na eucaliptocultura brasileira, destaca-se a formação do híbrido urograndis. O urograndis é um híbrido das espécies *E. grandis* e *E. urophylla* e a união destas duas espécies visou o aproveitamento de características de elevado interesse comercial: o *E. grandis* apresenta crescimento rápido da árvore e alta produtividade enquanto que o *E. urophylla* apresenta uma maior capacidade de rebrota, rusticidade e maior densidade de madeira (EMBRAPA, 2003), considerado altamente produtivo em várias regiões do país, fornecendo matéria prima para os setores de celulose e metalurgia (FONSECA et al., 2010).

O eucalipto se reproduz predominantemente por alogamia, apresentando flores hermafroditas e protândricas, sendo os insetos responsáveis por sua polinização (FONSECA et al., 2010).

A madeira produzida apresenta diversas finalidades, dentre ela destacam-se a produção de celulose e papel, geração de energia, biorredutor na siderurgia, manufatura de painéis à base de madeira reconstituída, obtenção de madeira roliça, produção de sólidos madeiráveis a partir de serrados e laminados (PALUDZYSZYN FILHO e SANTOS, 2011).

Em 2012, a área ocupada por plantios florestais de Eucalipto e Pinus no Brasil totalizou 6.664.812 ha, sendo 76,6% correspondente à área de plantios de Eucalipto (5.102.030 ha) e os estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Mato Grosso do Sul os mais representativos (ABRAF, 2013).

Dados levantados pela ABRAF (2013) indicam uma desaceleração do crescimento das áreas com plantios florestais. Isto se deve às restrições impostas pelo governo brasileiro para a compra de terras por grupos nacionais com composição majoritária de capital estrangeiro; à uma redução da atividade econômica nos principais países importadores de produtos florestais (Estados Unidos e países da União Europeia); e excessiva burocratização nos processos de licenciamento ambiental de novos projetos florestais e industriais no país.

Tendo em vista este panorama nacional, há a necessidade de um maior aproveitamento das áreas destinadas aos plantios, visando um aumento na produtividade dos mesmos. Neste contexto, o melhoramento genético contribui para a obtenção de plantas mais adaptadas às adversidades ambientais, apresentando uma maior eficiência biológica (BORÉM e RAMALHO, 2011).

Atualmente, as plantações de eucalipto estão presentes em regiões diversas do mundo, localizadas em diferentes altitudes e tipos de solo e sob diferentes regimes pluviométricos (VITAL, 2007). Em áreas marginais aos cursos d'água, tais plantações têm sua produtividade comprometida devido ao estresse sofrido pelas espécies cultivadas nesses locais, uma vez que estes sofrem frequentemente com períodos de alagamentos afetando as trocas gasosas entre as plantas e o ambiente (LIAO e LIN, 2001).

2.2. Estresse Abiótico

Em situações naturais, as plantas estão frequentemente expostas a condições ambientais adversas que podem causar estresse. Estresse é um fator externo que exerce alguma influência negativa sobre determinado organismo. A capacidade que este

organismo apresenta de se adaptar a uma condição desfavorável é conhecida como tolerância e está intimamente associada ao conceito de estresse (OLIVEIRA, 2004).

A tolerância pode ser expressa por meio de adaptação ou aclimação e embora estes dois termos sejam considerados comumente como sinônimos, apresentam distinções bem estabelecidas. Adaptação refere-se a um nível de resistência geneticamente determinado enquanto aclimação refere-se a um aumento da tolerância em decorrência de prévia exposição ao estresse (OLIVEIRA, 2004).

O excesso de água no ambiente radicular das plantas quer seja por deficiência na drenagem do solo ou excesso de chuvas e irrigações, pode gerar consequências bastante negativas uma vez que bloqueia ou dificulta a difusão de O_2 e outros gases entre o solo e a atmosfera (DREW, 1997). O O_2 dissolvido é lentamente difundido em água, permanecendo oxigenado apenas poucos centímetros superficiais do solo (OLIVEIRA, 2004). Durante e após as chuvas, o ar do solo é substituído pela água e, nesse momento, a quantidade de oxigênio torna-se baixa, podendo causar hipoxia ou chegar a uma anoxia da raiz (BUCKERIDGE et al., 2004). O alagamento em solos tem sido considerado o maior estresse abiótico impondo restrições às raízes e afetando, portanto, o crescimento e desenvolvimento das plantas (DAT et al., 2006).

Situações de normoxia são caracterizadas pelo metabolismo aeróbico, regeneração de NAD^+ , principalmente via cadeia transportadora de elétrons, e produção de ATP via fosforilação oxidativa mitocondrial, e nesta situação o conteúdo de ATP celular é normal (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

Hipoxia é caracterizada pela redução parcial da disponibilidade de oxigênio. Sob essas condições, as células ainda são capazes de produzir ATP via fosforilação oxidativa, mas a taxa de consumo de oxigênio é reduzida. Dessa forma, as células otimizam o uso energético através de uma reorganização de seu fluxo metabólico (ROCHA et al., 2010).

Condições de anoxia são caracterizadas pelo metabolismo anaeróbico, regeneração de NAD^+ via fermentação láctica e alcoólica, e produção de ATP apenas via glicólise. O conteúdo de ATP celular é baixo enquanto que o de ADP é elevado (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). O declínio na disponibilidade energética gera consequências drásticas nos processos celulares, podendo levar a um desequilíbrio ou a uma deficiência nutricional (DAT et al., 2006). Além disso, tais situações associadas a mudanças ambientais podem tornar a planta mais suscetível a outros estresses, principalmente às infecções patogênicas (PARENT et al., 2008).

A deficiência em oxigênio é típica de solos inundados. E esta condição reduz o crescimento e a sobrevivência de espécies tidas como sensíveis ou não adaptadas levando a um prejuízo severo em poucas horas de privação de oxigênio (GLENZ et al., 2006).

2.3. Hipoxia

Hipoxia é caracterizada como uma condição, ambiental ou experimental, onde os níveis de oxigênio disponíveis encontram-se abaixo da quantidade necessária à manutenção do metabolismo da planta (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

Dentre as possíveis causas da hipoxia, destacam-se a compactação e o excesso de água no solo. A compactação do solo, quer seja por tráfego intenso de veículos pesados ou por pisoteio constante de animais, reduz o volume de poros, especialmente os de maiores dimensões (macroporos). Com isso, há uma redução no espaço físico

onde o O₂ ficaria armazenado, associado à dificuldade de drenagem da água nestas situações (DEBIASI et al., 2005).

O sistema radicular é o primeiro a ser afetado pela falta de O₂, acarretando em danos devido à falta de ATP para governar processos metabólicos essenciais. Dessa forma, falta energia para sustentar os processos fisiológicos dependentes da parte aérea vegetal. O crescimento e a sobrevivência de muitas espécies vegetais podem ser prejudicados e, se tratando de espécies de interesse comercial, a produtividade pode ser reduzida consideravelmente (OLIVEIRA, 2004).

A disponibilidade de oxigênio é mais crítica para a rizosfera, pois o O₂ disponível no solo é utilizado também por fungos, bactérias, protozoários e animais que aí vivem. Muitas raízes conseguem sobreviver por um determinado período de tempo utilizando apenas a respiração anaeróbica como fonte energética, porém esta não é suficiente para manter o crescimento da planta (BUCKERIDGE et al., 2004).

Com a redução nos níveis de O₂ na Cadeia Transportadora de Elétrons (ETC) há a formação de radicais livres, também conhecidos como ROS (Reactive Oxygen Species), que podem causar danos em macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA alterando, consequentemente, a funcionalidade de células e tecidos (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). ROS são moléculas derivadas do O₂, como ânions superóxido (O₂⁻), peróxidos de hidrogênio (H₂O₂) e radicais de hidroxila (OH), sendo este último o mais reativo e destrutivo para as macromoléculas supracitadas (PANNUNZIO e STOREY, 1998).

Visando reverter os problemas causados pela hipoxia, algumas plantas adotam mecanismos de escape, conhecida como LOES (Low Oxygen Escape Syndrome) (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). Tais mecanismos têm alto custo energético uma vez que são ativados por genes específicos. São caracterizados pela restrição geral no crescimento e metabolismo celular, sendo, portanto, típicas de espécies capazes de suportar inundações de curta duração (BAILEY-SERRES et al., 2012). Outra resposta é conhecida como LOQS (Low Oxygen Quiescence Syndrome) (BAILEY-SERRES E VOESENEK, 2010), também denominada como tolerância real à hipoxia, por ser um tipo de resposta em nível de tolerância ao estresse em vez de evitá-lo. As respostas dessas espécies estão mais relacionadas a mecanismos de quiescência, como alterações em rotas metabólicas, aumento da eficiência energética, ajuste entre produção e consumo de ATP, manutenção do pH citosólico e redução dos danos provocados pela hipoxia (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008), podendo causar lesões nas folhas e redução no crescimento das plantas (HANCOCK et al., 2011).

O grau de deficiência de O₂ depende, também, de fatores inerentes às espécies vegetais, tais como: reposição de oxigênio através da fotossíntese e consumo celular de oxigênio através da atividade metabólica (GUPTA et al., 2009).

As espécies consideradas tolerantes apresentam uma plasticidade no que se refere ao ajuste fisiológico sob tais condições de estresse. Esse ajuste resulta em aclimações morfológicas, anatômicas e metabólicas (VOESENEK e BAILEY-SERRES, 2013).

A tolerância a esse tipo de estresse envolve a regulação do pH citosólico evitando a acidificação do meio, a manutenção da glicólise para a formação de ATP e a regeneração de NAD⁺ a partir de NADH de modo a manter o funcionamento da glicólise (SUMMERS et al., 2000).

O Eucalipto é considerado uma espécie muito sensível à deficiência de oxigênio e ao excesso de água no solo (CURI, 2000). No entanto, alguns autores observaram comportamentos típicos de plantas tidas como tolerantes em algumas espécies do gênero *Eucalyptus*: *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. robusta*, *E. gradis* e *E. saligna*

(CLEMENTS et al., 1978; SENA GOMES e KOZLOWSKI, 1980; BLAKE e REID, 1981). Tais comportamentos consistiram, basicamente, em alterações morfológicas, como formação de aerênquima, hipertrofia do córtex da haste e produção de raízes adventícias, sendo escassos estudos relacionados ao mecanismo molecular de resposta ao estresse.

2.4. Metabolismo Respiratório das Plantas sob Hipoxia

A primeira consequência do déficit de O₂ é a redução no metabolismo aeróbico, com consequente diminuição na geração de ATP (GHARBI et al., 2007), uma vez que sem o aceptor final de elétrons a fosforilação oxidativa não pode continuar. Baixos níveis de ATP geram uma crise energética reduzindo a integridade das membranas lipídicas (RAWYLER et al., 1999) e obrigando as plantas a alterarem etapas de seu metabolismo durante o período de estresse. Essa adaptação metabólica ajuda a manter a produção de ATP e a regeneração de NAD⁺ (DENNIS et al., 2000), ambos os produtos da cadeia respiratória aeróbica.

Quando a disponibilidade de O₂ decresce a níveis capazes de limitar a fosforilação oxidativa, as células das plantas dependem de vias metabólicas alternativas para a produção de ATP. Nestas condições, a principal fonte energética é a via glicolítica que produz 2 ATPs e duas moléculas de piruvato por unidade de hexose reduzindo, simultaneamente, NAD⁺ à NADH. A resposta metabólica à privação de O₂ está relacionada com a disponibilidade e mobilização de carboidratos (VAN DONGEN et al., 2003). Em algumas plantas e tecidos, a indução de amilases em condição de estresse promove a conversão do amido em glicose (BOLOGA et al., 2003), aumentando consideravelmente a concentração de carboidrato disponível para a glicólise.

Existem evidências claras indicando que as espécies sensíveis e tolerantes diferem entre si no que diz respeito à habilidade para manter o suprimento adequado de carboidratos durante longos períodos de hipoxia (VU e YELENOSKY, 1991; FERNER et al., 2012; LEPROVOST et al., 2012). Espécies consideradas tolerantes são capazes de suprir parcialmente a demanda por carboidratos solúveis através da degradação das reservas de amido (KREUZWIESER et al., 2009; LEPROVOST et al., 2012).

A Figura 1 apresenta a aclimatação metabólica que as plantas sofrem em condição de hipoxia, evidenciando as rotas alternativas ativadas nestas situações (setas azuis). As plantas apresentam duas vias independentes para o catabolismo da sacarose, a sacarose sintase bidirecional UDP-dependente (SUS) e a invertase unidirecional (INV). O custo líquido para a entrada na glicólise é um mol de pirofosfato (PPi) por mol de sacarose por via SUS enquanto que o custo da via INV é de 2 mol de ATP por mol de sacarose, apresentando portanto, uma desvantagem energética (BOLOGA et al., 2003). Estudos realizados com espécies de algodão (*Gossypium hirsutum*), híbridos de *Populus alba* X *Populus tremula*, *Arabidopsis* e carvalho (*Quercus robur* L. e *Q. pétre*a Matt. Liebl.), em condição de estresse, indicaram mudanças nos níveis de transcritos em raízes durante a quebra da sacarose, sendo a via INV substituída pela degradação via SUS (KREUZWIESER et al., 2009; CHRISTIANSON et al., 2010; LEPROVOST et al., 2012).

para a fermentação (GOUT et al., 2001; KOLB et al., 2002; KREUZWIESER et al., 2009).

Durante a privação de O₂, a piruvato descarboxilase (PDC) converte piruvato em acetaldeído, que é metabolizada pela álcool desidrogenase (ADH) para o etanol, com a regeneração de NAD⁺ para sustentar a glicólise (GIBBS e GREENWAY, 2003). A produção de etanol é benigna uma vez que é rapidamente difundida para fora das células, enquanto que o acetaldeído intermediário é tóxico. A Acetaldeído desidrogenase (ALDH) catalisa a conversão de acetaldeído em acetato, com a concomitante redução do NAD⁺ para NADH (LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007). Sob condições limitantes de O₂, ALDH consome NAD⁺ e pode, portanto, limitar a glicólise.

Em condições de hipoxia produz-se, também, lactato. Sabe-se que a transição do ácido láctico para a fermentação alcoólica é controlada pelo pH citosólico. O declínio de aproximadamente 0,6 unidade no pH, favorece a ação dos catalisadores das PDCs, ou seja, a acidificação do meio promove a produção de etanol (ROBERTS et al., 1989) que, conseqüentemente, auxilia no processo de desacidificação do citosol. Assim, a passagem do estado láctico à fermentação alcoólica é essencial para a manutenção do pH citosólico (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

Embora já tenha sido comprovado em várias espécies que a glicólise e as rotas fermentativas são fundamentais para sobrevivência à hipoxia, o simples aumento da atividade dessas rotas não é o suficiente para uma prolongada tolerância a este estresse (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). A crise na disponibilidade de ATP continua pois apenas a glicólise não é suficiente para suprir a demanda energética, produzindo 2 a 4 mols de ATP por molécula de hexose comparado com 30 a 36 mol de ATP da cadeia transportadora de elétrons (GIBBS e GREENWAY, 2003). Além dos principais produtos finais da fermentação, a deficiência de O₂ está associada com a elevação do malato, da alanina, ácido γ -aminobutírico (GABA) e succinato (DIXON et al., 2006; MUSTROPH et al., 2010; NARSAI et al., 2011).

Estudos realizados em espécies arbóreas tropicais adaptadas a solos alagados, indicaram que durante as fases iniciais de hipoxia as raízes não são capazes de produzir elevadas quantidades de etanol e lactato, transformando piruvato para a produção de malato (JOLY, 1994). Portanto, a quantidade de malato produzida é dependente da disponibilidade de oxigênio (SOUSA e SODEK, 2002). Roberts et al. (1992), defendem um importante papel do malato no metabolismo hipóxico, onde este seria convertido à piruvato que, por sua vez, sofreria transaminação para formar Alanina.

Em condições de hipoxia muitas espécies de plantas acumulam alanina, importante aminoácido constituinte das proteínas (MIYASHITA et al., 2007), que desempenha fundamental papel no retorno à normoxia pela conversão em piruvato por meio da reação de transaminação catalisada pela atividade da enzima alanina aminotransferase (AlaAT) (SOUZA e SODEK, 2003). Esta pode estar presente em altas concentrações sem gerar conseqüências prejudiciais às plantas (REGGIANI et al., 1988). Algumas espécies apresentam uma rápida indução da expressão de AlaAT, um gene que codifica para a enzima alanina aminotransferase, bem como um aumento na atividade desta enzima durante a privação de oxigênio (MUENCH e GOOD, 1994), esta indução pode explicar o potencial incremento na produção deste aminoácido (MIYASHITA et al., 2007).

O GABA é um aminoácido que se acumula em diversas condições de estresse, dentre elas a deficiência em O₂. O aumento em sua produção pode ser explicado pela redução do pH citoplasmático sob condições de hipoxia (CARVALHO, 2012). A interconversão deste aminoácido auxilia na regulação do pH celular contribuindo para a

sobrevivência das plantas nestas situações de deficiência (RICARD et al., 1994). É também considerado um composto sinalizador que contribui para a biossíntese de etileno e, portanto, está envolvido em adaptações morfológicas de plantas sob estresse hipóxico (KREUZWIESER et al., 2009).

O succinato é um metabólito resultante da operação parcial do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA), na direção inversa. A produção de succinato auxilia na tolerância a hipoxia através da produção de ATP dentro da mitocôndria (MENEGUS et al., 1989).

Estudos indicam que o metabolismo do nitrogênio também está envolvido na regulação celular com a redução da disponibilidade de oxigênio (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008), no entanto a sua relação com a tolerância a hipoxia ainda não está completamente elucidada (ROCHA et al., 2010) tornando-se evidente a necessidade de estudos complementares.

2.5. Metabolismo do Nitrogênio

Desde a última década, muitos estudos têm-se atentado ao metabolismo do N sob condições de hipoxia (ALLÈGRE et al., 2004). O Nitrogênio é um dos elementos minerais mais abundantes nas plantas e é encontrado em moléculas importantes, como proteínas e ácido nucleicos. No solo, está presente nas formas de Nitrato (NO_3^-) e Amônio (NH_4^+). Ambas as formas são aproveitáveis pelas plantas, no entanto, o NH_4^+ é rapidamente convertido à NO_3^- por bactérias nitrificadoras, através de um processo conhecido como nitrificação (SODEK, 2004). Após a absorção, o nitrato pode ser assimilado nas próprias raízes, nas folhas, ou em ambos os órgãos enquanto que o amônio é principalmente assimilado nas raízes devido sua toxicidade (ANTUNES et al., 2008).

Em plantas superiores, a absorção de nitrato é induzida (BRETELIER e SIEGERIST, 1984) enquanto o processo de absorção do amônio ocorre de forma passiva, uma vez que não é exigida energia metabólica (FERNANDES e ROSSIELLO, 1986).

A absorção do nitrato pelas raízes ocorre através de um processo denominado simporte, por meio de transportadores específicos localizados na superfície da célula. Este íon é reduzido a nitrito nas próprias raízes ou na parte aérea, chegando às folhas via xilema. O nitrito originado é transportado para o interior dos cloroplastos nas folhas e dos plastídeos nas raízes. São nestes compartimentos que o nitrito é reduzido a amônio e o nitrogênio amoniacal é assimilado em aminoácidos (CAMPBELL, 2001).

Quando o amônio é absorvido pelas raízes, o nitrogênio é rapidamente incorporado a aminoácidos; já na absorção do nitrato, é necessário ocorra redução a amônio para que a planta possa utilizar o nitrogênio. Este processo de redução requer energia e é mediado pelas enzimas Redutase do Nitrato (RN) e Redutase do Nitrito (RNi), respectivamente (BARKER e MILL, 1980). Apesar de haver um custo energético, este é menor do que no caso de desintoxicação do amônio (GUO et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram que o fornecimento de NO_3^- às raízes possibilitaram uma melhora no estado redox (NADH/NAD^+) (IGAMBERDIEV e HILL, 2004), uma vez que contribui para a aclimação celular em condições de hipoxia regenerando NAD^+ a partir de NADH (BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008). Esta condição proporciona, também, uma carga energética mais elevada através do consumo do poder redutor (NADH) gerado pela glicólise e pela redução do nitrato a nitrito (NO_2^-) (STOIMENOVA et al., 2003). A absorção e redução do nitrato pode ser uma via alternativa para a respiração dependente de oxigênio durante situações de hipoxia ou anoxia, estimulando uma adaptação gradual das raízes de plantas sob condições

anaeróbicas, especialmente em espécies consideradas tolerantes a esse estresse (MORARD et al., 2000).

2.6. Atividade Enzimática

O estudo da atividade enzimática em situações de estresse está relacionado ao entendimento das mudanças metabólicas e dos mecanismos de defesa que ocorrem nas plantas quando submetidas a essas condições (BURDON e MARSHALL, 1983).

Com relação ao estresse causado por situações hipóxicas, alguns trabalhos vêm demonstrando a participação da redutase do nitrato (RN) como uma enzima chave no processo de tolerância induzido por estresse (BOTREL e KAISER, 1997; ALLÈGRE et al., 2004; LORETI et al., 2005; LASANTHI-KUDAHETTIGE et al., 2007; STOIMENOVA et al., 2007; BAILEY-SERRES e VOESENEK, 2008).

A RN é considerada enzima chave na regulação do metabolismo do N, uma vez que o nitrato absorvido pelas raízes deve ser reduzido a amônio antes de ser incorporado em compostos orgânicos (CARVALHO, 2005).

As plantas apresentam muitos mecanismos que regulam a atividade, o nível e a alocação da RN em resposta a uma variedade de condições químicas e ambientais (BUCHANAN et al., 2002). Esta enzima está sujeita a controles metabólicos transcricionais e pós-transcricionais (CAMPBELL, 1999). O controle transcricional envolve mudanças na expressão gênica enquanto que a modulação pós-transcricional da atividade da RN é devido a modificações enzimáticas (KAISER e HUBER, 1994). As modificações pós-traducionais ocorrem em resposta a mudanças em diferentes fatores ambientais, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática, em apenas poucos minutos (ATHWAL et al., 1998).

A nível transcricional, é regulada através da disponibilidade do substrato NO_3^- e do produto final da via de assimilação do nitrogênio, o aminoácido glutamina. A nível pós-traducional, a enzima RN é regulada através do mecanismo de fosforilação-desfosforilação (KAISER et al., 1999). A luz é considerada o fator mais eficaz na regulação (MEYER e STITT, 2001) e sua atuação se dá pelo estímulo da proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina da proteína RN, promovendo sua ativação (CARVALHO, 2005).

A acidificação induzida por situações de hipoxia pode aumentar a atividade da RN em virtude de seu baixo pH ótimo (STOIMENOVA et al., 2007). No tecido radicular, há um acréscimo em sua atividade, quer seja através de um aumento na expressão gênica (MATTANA et al., 1996) ou devido a uma ativação pós-traducional (BOTREL e KAISER, 1997).

3. OBJETIVO

Avaliar a atividade da enzima Redutase do Nitrato (RN) e a concentração de nitrato antes e após o tratamento hipóxico em raízes e folhas de dois clones de Eucalipto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condição Experimental e Caracterização dos Clones

As análises moleculares e enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Instituto de Biologia localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Foram utilizados os clones 2719 (tolerante) e 1213 (sensível) de híbridos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, fornecidos pela CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira S. A.) localizada em Belo Horizonte – MG. As condições de tolerância e sensibilidade foram determinadas por meio de observações de campo.

4.2. Atividade da Redutase do Nitrato

Para a realização do experimento, mudas dos clones 2719 (tolerante) 1213 (sensível) com 20 cm de altura, apresentando folhas completamente expandidas, foram selecionadas. Para o tratamento hipóxico foram excisadas as raízes e as folhas do terceiro par de folhas a partir do ápice dos ramos medianos dessas mudas e mantidas submersas em água ultrapura durante 3h, simulando situação hipóxica. A partir de então, coletaram-se raízes laterais e lâminas foliares sem a nervura central para a determinação da atividade da redutase do nitrato. Esta metodologia foi utilizada com o objetivo de anular os efeitos dos fatores que influenciam na atividade da RN. Para o tratamento controle as amostras de tecidos radicular e foliar foram coletadas nos clones mantidos em substrato.

As repetições foram compostas por 3 amostras de cada tecido vegetal tanto para o tratamento hipóxico como para o controle, em ambos os indivíduos, totalizando 24 amostras.

A determinação da atividade da enzima redutase do nitrato foi realizada segundo a metodologia descrita por JAWORSKI (1971), com algumas modificações detalhadas a seguir. As amostras de 0,20g de tecido vegetal foram colocadas em tubos eppendorf de 2,0mL contendo 1,5mL de meio de incubação, composto por 0,1M de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4/KH_2PO_4) em pH 7,5 e em 1% de isopropanol. A incubação foi conduzida a 30°C por uma hora, no escuro.

Retirou-se uma alíquota de 200 μ L do meio de incubação, sendo a reação paralisada pela adição de 400 μ L de sulfanilamida em 1% em HCl 3N e 400 μ L de N-1naftil etilenodiamina hidrocloreto a 0,02%. Após cinco minutos de repouso, realizou-se a filtragem, seguida da leitura de absorbância, a 540 nm, para a determinação da concentração de nitrito (Figura 2). A atividade da enzima foi expressa em mmoles de $NO_2^- \cdot g^{-1}$ de matéria fresca, por hora.

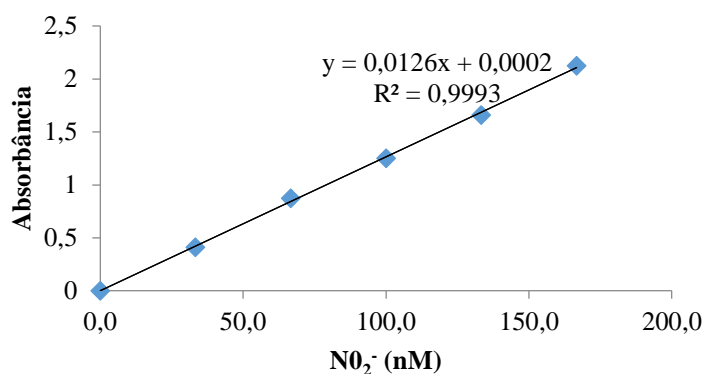


Figura 2. Curva padrão de nitrito em concentrações variando de 0 a 500 nM de NO₂⁻.

4.3. Quantificação da Concentração de Nitrato

A determinação da concentração de nitrato foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BREMNER e KEENEY (1965), com algumas modificações visando a adaptação para tecidos vegetais. As condições experimentais foram as mesmas descritas no item 4.2.

Dos tecidos coletados, 0,75g foram macerados e logo após foi adicionado 5mL de solução extratora contendo metanol e água nas proporções 35:10, respectivamente. Transferiu-se 1,5mL do extrato em tubos *ependorf* de 2,0mL acrescentando, a cada tubo, 0,5mL de clorofórmio.

As amostras foram mantidas durante 24h em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período de repouso, as amostras foram centrifugadas a 600g por 10min. Em 1,2mL do sobrenadante foram acrescentados 300μL de clorofórmio e 450μL de água destilada e autoclavada. Os tubos foram levados novamente à centrífuga onde permaneceram por 10min a 1075g para obtenção do extrato aquoso. O extrato aquoso foi coletado e transferido para tubos *ependorf* de 2,0mL, sendo mantidos abertos e em local escuro a 37°C durante um período de 24h. Esta etapa foi realizada visando eliminar o excesso de metanol e resíduos de clorofórmio presentes. O volume final obtido foi de 600μL para cada amostra.

A partir de então, realizou-se diluição de 10μL do extrato aquoso em 10μL de água ultrapura. Ao extrato diluído foi acrescentado 80μL de reagente salicílico composto por ácido salicílico a 5% em H₂SO₄ concentrado. Após agitação em vortex para homogeneização, o extrato foi mantido em temperatura ambiente por 20 min sendo adicionado, em seguida, 1,9mL de NaOH 2N. Após resfriado à temperatura ambiente, efetuaram-se as leituras em espectrofotômetro a 410nm.

4.4. Análise Estatística

Os dados obtidos para a atividade da redutase do nitrato e concentração de nitrato foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em um esquema fatorial 2² (2 clones e 2 condições) e por meio do *software Microsoft Office Excel 2007*, as médias foram comparadas pelo teste F à nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade da Redutase do Nitrato e Quantificação da Concentração de Nitrato

Para o clone 2719 foi possível observar que no tratamento controle a atividade da enzima RN foi maior no tecido radicular do que nas folhas (Tabelas 1 e 2). Nesta mesma condição foi verificada uma menor concentração de nitrato nas raízes sugerindo, que este tecido é o principal responsável pela redução de grande parte do nitrato absorvido.

Tabela 1. Atividade enzimática da Redutase do Nitrato ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$) e da concentração de nitrato ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$) em raízes dos clones 2719 (tolerante) e 1213 (sensível) de *Eucalyptus urograndis*, submetidas à hipoxia.

Genótipos	Atividade Enzimática em raízes ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$)			Concentração de nitrato em raízes ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$)		
	Controle	Hipoxia	Média	Controle	Hipoxia	Média
Clone 2719 (tolerante)	69,02 Aa	42,84 Ab	55,93	1,60 Aa	0,11 Bb	0,85
Clone 1213 (sensível)	20,27 Ba	26,39 Ba	20,80	2,48 Aa	2,25 Aa	2,36
Média	42,55	34,18	38,37	2,04	1,18	1,61

Médias seguidas de letras diferentes representam diferença significativa, segundo o teste F à nível de 5% de significância. Letras maiúsculas referem-se às colunas e minúsculas às linhas.

Tabela 2. Atividade enzimática da Redutase do Nitrato ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$) e da concentração de nitrato ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$) em folhas dos clones 2719 (tolerante) e 1213 (sensível) de *Eucalyptus urograndis*, submetidas à hipoxia.

Genótipos	Atividade Enzimática em folhas ($\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$)			Concentração de nitrato em folhas ($\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$)		
	Controle	Hipoxia	Média	Controle	Hipoxia	Média
Clone 2719 (tolerante)	5,37 Bb	18,82 Aa	12,10	7,90 Aa	3,98 Ab	5,94
Clone 1213 (sensível)	16,27 Aa	18,35 Aa	17,31	3,32 Ba	3,21 Aa	3,27
Média	10,82	18,59	14,70	5,61	3,60	4,60

Médias seguidas de letras diferentes representam diferença significativa, segundo o teste F à nível de 5% de significância. Letras maiúsculas referem-se às colunas e minúsculas às linhas.

Após a indução do tratamento hipóxico, a atividade da RN nas raízes foi reduzida de 69,02 para 42,84 $\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ e, simultaneamente, a concentração de nitrato neste tecido passou de 1,60 para 0,11 $\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ (Tabela 1). Nas folhas do clone 2719, observou-se um aumento de 5,37 para 18,82 $\mu\text{mol de N-NO}_2^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$ na atividade da RN enquanto a concentração de nitrato reduziu de 7,90 para 3,98 $\text{nmol de N}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, sob hipoxia (Tabela 2). O aumento observado na atividade enzimática das folhas deste genótipo pode estar relacionado com a ausência do sistema radicular que, para este clone, foi considerado o principal responsável pela redução do nitrato. Uma vez que a planta não estava completa, o órgão teve que trabalhar de forma independente para suprir a demanda metabólica e esta condição

levou a um aumento na atividade da RN proporcionando uma maior redução de nitrato nas folhas. A redução na concentração de nitrato pode ser explicada porque a medida em que há um aumento na atividade enzimática da RN, mais rapidamente o nitrato é assimilado (OAKS, 1994).

Os principais locais de redução do NO_3^- em plantas são as folhas e raízes. A importância desses tecidos na assimilação do NO_3^- varia de acordo com a espécie e depende da atividade da RN e disponibilidade de NO_3^- no meio. Algumas espécies apresentam uma baixa capacidade em assimilar o nitrato nas raízes, enviando-o para as folhas, através do xilema, para que então ocorra a redução em nitrito. As espécies que apresentam uma alta capacidade de redução do nitrato em raízes, dificilmente tem essa capacidade superada pela quantidade de nitrato absorvido, dessa forma, a relevância das folhas neste caso é pequena (SODEK, 2004).

A assimilação de nitrogênio em folhas pode reduzir os gastos energéticos requeridos por este processo quando comparado com a assimilação em raízes submetidas à hipoxia (OLIVEIRA et al., 2013). Isso se deve ao fato de que o ATP e redutores de assimilação de nitrogênio nas folhas vêm diretamente do transporte fotossintético de elétrons, representando, assim, um baixo custo energético em condições em que a luz não é limitada (SMIRNOFF e STEWART, 1985).

A RN é uma enzima altamente regulada (KAISER et al., 1999), apresentando respostas às alterações ambientais internas e externas por meio de ajustes balanceados e coordenados por reações metabólicas específicas. Tais respostas são conhecidas como regulação alostérica (KENNELLY e RODWELL, 2013). A nível transcricional em plantas superiores, a RN pode ser positivamente regulada pela disponibilidade de nitrato (COYNE, 2010; FALCAO et al., 2010; KONISHI e YANAGISAWA, 2011).

Alguns autores observaram que, em anaerobiose, plantas tolerantes apresentam uma capacidade de reduzir a quantidade de nitrato endógeno, sugerindo a existência de um mecanismo de utilização do nitrato durante a hipoxia (REGGIANI et al., 1985; REGGIANI et al., 1995; BOTREL et al., 1996; SOUSA e SODEK, 2002). Entretanto, há controvérsias quanto ao aumento ou redução da atividade da RN sob deficiência de oxigênio (BOTREL et al., 1996; ALLÈGRE et al., 2004; MORARD et al., 2004; BRANDÃO e SODEK, 2009).

Resultados semelhantes aos observados nas raízes do clone 2719 também foram encontrados em raízes de plantas de soja (*Glycine max*) submetidas à hipoxia, onde foi constatada uma redução significativa na atividade da RN (BRANDÃO, 2005). Raízes de seringueira (*Hevea spp*) apresentaram uma maior atividade enzimática da RN no tratamento controle, reduzindo após a indução da hipoxia (PELACANI, 1993).

O clone 1213 não apresentou um aumento significativo na atividade da RN tanto em raízes como em folhas e, conseqüentemente, não foi observada alteração significativa na concentração de NO_3^- nestes tecidos no tratamento hipóxico em relação ao controle (Tabelas 1 e 2). Tais observações indicam que este genótipo não teve uma resposta eficiente na utilização do nitrato em condições de estresse.

Entre os clones 2719 e 1213 foi verificada uma diferença significativa na atividade da RN em raízes (Tabela 1) tanto no tratamento controle como no hipóxico. O clone 2719 apresentou uma maior eficiência na ativação da RN, quando comparado ao clone 1213, mesmo sob redução na disponibilidade de O_2 . Tal comportamento levanta a hipótese de que este genótipo apresenta uma maior resposta adaptativa. Ainda em termos comparativos, quanto à concentração de nitrato, o clone 2719 apresentou uma maior eficiência na redução do mesmo, em condições de hipoxia.

Entre os clones 2719 e 1213, as diferenças na atividade enzimática e na concentração de nitrato do tecido foliar só foi significativa nos tratamentos controle.

Nesta situação, a atividade da RN foi maior no clone 1213 e, conseqüentemente, a quantidade encontrada de nitrato neste tecido foi menor. No entanto, tal comportamento não foi mantido sob hipoxia. Em situações de estresse, a atividade enzimática do clone 2719 aumentou, se igualando a observada no clone 1213 (Tabela 2). Apesar de ambos os clones apresentarem uma mesma atividade da RN, o clone 2719 mostrou-se mais eficiente na redução do nitrato. Este comportamento pode indicar uma maior resposta deste genótipo em situações de hipoxia, uma vez que o nitrato reduzido é utilizado na formação de aminoácidos e proteínas e o NADH oxidado na reação de redução do nitrato pode ser utilizado como transportador de elétrons na via respiratória para a produção final de ATP.

6. CONCLUSÃO

A atividade da RN no clone 2719 foi maior nas raízes que nas folhas indicando que neste órgão ocorre a maior parte da redução do nitrato absorvido. Com a redução da disponibilidade de oxigênio, houve um aumento da atividade enzimática em folhas deste genótipo.

Para o clone 1213 não foi observado uma variação das características avaliadas nas situações controle e hipóxica, uma vez que os níveis de atividade enzimática e concentração de nitrato tanto no tecido radicular quanto foliar mantiveram-se os mesmos.

Comparando ambos os genótipos, o clone 2719 apresentou uma maior resposta adaptativa sob hipoxia, sendo mais eficiente na redução do nitrato tanto em folhas como em raízes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico ABRAF 2010 ano base 2009 / ABRAF**. Brasília, 2010. 140 p.

ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012 / ABRAF**. Brasília, 2013. 148 p.

ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: A possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, 2004.

ANTUNES, F. et al. Nitrogen stress and the expression of asparagine synthetase in roots and nodules of soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 04, p. 736-743, 2008.

ATHWAL, G. S.; HUBER, J. L.; HUBER, S. C. Biological significance of divalente metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. **Plant Cell Physiology**, v. 39, n. 10, p. 1065-1072, 1998.

- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 01, p. 313–339, 2008.
- BAILEY-SERRES, J.; LEE, S. C.; BRINTON, E. Waterproofing crops: effective flooding survival strategies. **Plant Physiology**, v. 160, n. 04, p. 1698-1709, 2012.
- BARKER, A. V.; MILL, H. A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. **Horticultural Review**, v. 02, n. 01, p. 395-423, 1980.
- BLAKE, T. J.; REID, D. M. Ethylene, water relations and tolerance to waterlogging of three *Eucalyptus* species. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 8, n. 06, p. 497-505, 1981.
- BOLOGA, K. L. et al. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. **Plant Physiology**, v. 132, n. 04, p. 2058–2072, 2003.
- BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Estresses abióticos: desafios do melhoramento de plantas nas próximas décadas. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Abióticos**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2011. cap. 1, p. 9-28.
- BOTREL, A.; MAGNE, C.; KAISER, W. M. Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 05, p. 645–652, 1996.
- BOTREL, A.; KAISER, W. M. Nitrate reductase activation state in Barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. **Planta**, v. 201, n. 04, p. 496-501, 1997.
- BRANDÃO, A. D.; SODEK, L. Nitrate uptake and metabolism by roots of soybean under oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 01, p. 13–23, 2009.
- BREMNER, J. M.; KEENEY, D. R. Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by steam-distillation methods. In: BLACK, C. A. **Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties**. 1. ed. Madison: American Society of Agronomy, 1965. cap 13, p. 1191-1206.
- BRETELER, H.; SIEGERIST, M. Effect of ammonium on nitrate utilization by roots of dwarf bean. **Plant Physiology**, v. 75, n. 04, P. 1099-1103, 1984.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 1. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2002. 1408 p.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Respiração. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. cap. 7, p. 198-216.

BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. The use of isozymes research. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plants genetics and breeding**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 1983. cap. 3, p. 401-412.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. **Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas**. 1. ed. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. cap. 5, p. 95-105.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology & Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 01, p. 277-303, 1999.

CAMPBELL, W. H. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: nitrate reductase. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 02, p. 194-204, 2001.

CARVALHO, P. G. **Efeitos do Nitrogênio no Crescimento e no Metabolismo de Frutanos em *Vernonia herbácea* (Vell.) Rusby**. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CARVALHO, P. A. **Metabolismos do Nitrogênio e Antioxidante em Plantas Jovens de Seringueira (*Hevea spp*) Submetidas à Baixa Disponibilidade de Oxigênio na Presença de Nitrato e/ou Amônio**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CHRISTIANSON, J. A. et al. Comparisons of early transcriptome responses to low-oxygen environments in three dicotyledonous plant species. **Plant Signalling and Behaviour**, v. 05, n. 08, p. 1006-1009, 2010.

CLEMENTS, J.; KIRK, A. M.; MILLS, P. D. The resistance to waterlogging of three Eucalyptus species. **Oecologia**, v. 34, n. 02, p. 125-131, 1978.

COYNE, K. J. Nitrate reductase (NR1) sequence and expression in the harmful alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). **Journal of Phycology**, v. 46, n. 01, p. 135-142, 2010.

CURI, N. Interpretação e decodificação do levantamento de solos das áreas da Aracruz Celulose S.A. no Espírito Santo e sul da Bahia para o cultivo de eucalipto. In: EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Levantamento generalizado e semidetalhado de solos da Aracruz Celulose S.A. no Espírito Santo e sul da Bahia para o cultivo de eucalipto**. 1. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 2000. cap. 3, p.70-80.

DAT, J. et al. Hypoxia stress: Current Understanding and Perspectives. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**. 3. ed. Isleworth: Global Science Books. 2006. cap. 20, p. 183-193.

DEBIASI, H. et al. Compactação do Solo. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000fu5hwsuz02wx5eo0c9slrao5yhele.html#>>. Acesso em: 3 de junho de 2014.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p. 89-97, 2000.

DIXON, M. H. et al. Physiological and metabolic adaptations of *Potamogeton pectinatus* L. tubers support rapid elongation of stem tissue in the absence of oxygen. **Plant & Cell Physiology**, v. 47, n. 01, p. 128–140, 2006.

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, n. 01, p. 223–250, 1997.

EMBRAPA FLORESTAS. **Plantio de Florestas de Rápido Crescimento para Madeira Nobre**: Alternativa de renda para pequenos e médios produtores rurais. Colombo: EMBRAPA, 2003. p. 1-2.

FALCAO, V. R.; OLIVEIRA, M. C.; COLEPICOLO, P. Molecular characterization of nitrate reductase gene and its expression in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 05, p. 613-622, 2010.

FERNER, E.; RENNENBERG, H.; KREUZWIESER, J. Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. **Tree Physiology**, v. 32, n. 02, p. 135-145, 2012.

FONSECA, S. M. et al. **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. 1 ed. Viçosa: UFV, 2010. 200 p.

GHARBI, I. et al. Effect of hexokinase activity on tomato root metabolism during prolonged hypoxia. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, n. 04, p. 508-517, 2007.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 01, p. 1–47, 2003.

GLENZ, C. et al. Flooding tolerance of Central European tree and shrub species. **Forest Ecology and Management**, v. 235, n. 01, p. 1-13, 2006.

GOUT, E. et al. Origin of the cytoplasmic pH changes during anaerobic stress in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies. **Plant Physiology**, v. 125, n. 02, p. 912-925, 2001.

GRIFFIN, A. R.; BURGESS, I. P.; WOLF, L. Patterns of natural and manipulated hybridization in the genus *Eucalyptus* L'Herit – a review. **Australian Journal of Botany**, v. 36, n. 1, p. 41-66, 1988.

GUO, S.; BRÜCK, H.; SATTELMACHER, B. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Plant and Soil**, v. 239, n. 02, p. 267-275, 2002.

GUPTA, K. J. et al. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. **Physiologia Plantarum**, v. 137, n. 04, p. 383–391, 2009.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 02, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. 4. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007. 888 p.

HANCOCK, J. T. et al. Hydrogen sulphide and signaling in plants. **Plant Sciences Reviews**, v. 06, n. 01, p. 33-39, 2011.

IGAMBERDIEV, A. U.; HILL, R. D. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2473-2482, 2004.

JAWORSKI, E. G. Nitrate Reductase Assay in Intact Plant Tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 06, p. 1274-1279, 1971.

JOLY, C. A. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Cambridge Journals**, v. 102, n. 01, p. 343-354, 1994.

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant Physiology**, v. 106, n. 03, p. 817-821, 1994.

KAISER, W. M.; WEINER, H.; HUBER, S. C. Nitrate reductase in higher plants: a case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiologia Plantarum**, v. 105, n. 02, p. 384-389, 1999.

KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W. Enzimas: Regulação das Atividades. In: MURRAY, R. K. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 29. ed. São Francisco: McGraw Hill, 2013. cap. 9, p. 84-93.

KOLB, R. M.; RAMYLER, A.; BRAENDLE, R. Parameters affecting the early seedling development of four neotropical trees under oxygen deprivation stress. **Annals of Botany**, v. 89, n. 05, p. 551-558, 2002.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate-responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in Arabidopsis. **Plant & Cell Physiology**, v. 52, n. 05, p. 824–836, 2011.

KREUZWIESER, J.; FÜRNISS, S.; RENNENBERG, H. Impact of waterlogging in the N-metabolism of flood tolerant and non-tolerant tree species. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 08, p. 1039-1049, 2002.

KREUZWIESER, J. et al. Differential response of Grey poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. **Plant Physiology**, v. 149, n. 01, p. 461-473, 2009.

- LASANTHI-KUDAHETTIGE, R. et al. Transcript profiling of the anoxic rice coleoptile. **Plant Physiology**, v. 144, n. 01, p. 218-231, 2007.
- LEPROVOST, G. et al. Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species. **Tree Physiology**, v. 32, n. 02, p. 119-134, 2012.
- LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, v. 25, n. 03, p.148-157, 2001.
- LORETI, E. et al. A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in *Arabidopsis* seedlings under anoxia. **Plant Physiology**, v. 137, n. 03, p. 1130–1138, 2005.
- MATTANA, M. et al. Expression of nitrogen assimilating enzymes in germinating rice under anoxia. **Plant Physiology & Biochemistry**, v. 34, n. 05, p. 653-657, 1996.
- MENEGUS, F. et al. Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. **Plant Physiology**, v. 90, n. 01, p. 29-32, 1989.
- MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signalling. In: LEA, P. J.; MOROT-GAUDRY, J. F. **Plant Nitrogen**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2001. cap. 1, p. 39-59.
- MIYASHITA, Y. et al. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 49, n. 06, p. 1108-1121, 2007.
- MORARD, P. et al. Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 07, p. 855–866, 2004.
- MORARD, P.; LACOSTE, L.; SILVESTRE, J. The effect of oxygen deficiency on the uptake of water and mineral nutrients by tomato plants in soilless culture. **Journal of Plant Nutrition**, v. 23, n. 08, p. 1063-1078, 2000.
- MUENCH, D. G.; GOOD, A. G. Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase: cDNA cloning and expression analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 03, p. 417-427, 1994.
- MUSTROPH, A. et al. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. **Plant Physiology**, v. 152, n. 03, p. 1484-1500, 2010.
- NARSAI, R. et al. Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. **New Phytologist**, v. 190, n. 02, p. 472-487, 2011.
- OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, n. 06, p. 739–750, 1994.

OLIVEIRA, P. L. Fisiologia do Estresse. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 25, p. 613-643.

OLIVEIRA, H. C.; FRESCHI, L.; SODEK, L. Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. **Plant Physiology & Biochemistry**, v. 66, n. 01, p. 141-149, 2013.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas**. 1. ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 66 p.

PANNUNZIO, T. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 221, n. 02, p. 277-292, 1998.

PARENT, C. et al. An Overview of Plant Responses to Soil Waterlogging. **Plant Stress**, v. 02, n. 01, p. 20-27, 2008.

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

RAWYLER, A. et al. Membrane Lipid Integrity Relies on a Threshold of ATP Production Rate in Potato Cell Cultures Submitted to Anoxia. **Plant Physiology**, v. 120, n. 01, p. 293-300, 1999.

REGGIANI, R.; BRAMBILLA, I.; BERTANI, A. Effect of exogenous nitrate on anaerobic metabolism in excised rice roots-I. Nitrate reduction and pyridine nucleotide pools. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n. 08, p. 1193-1199, 1985.

REGGIANI, R. et al. Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under hypoxia. **Plant & Cell Physiology**, v. 29, n. 06, p. 981-987, 1988.

REGGIANI, R.; BERTINI, F.; MATTANA, M. Incorporation of nitrate nitrogen into amino acids during the anaerobic germination of rice. **Amino Acids**, v. 09, n. 04, p. 385-390, 1995.

RICARD, B. et al. Plant metabolism under hypoxia and anoxia. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 01, p. 1-10, 1994.

ROBERTS, J. K. M. et al. Dependence of ethanolic fermentation, cytoplasmic pH regulation, and viability on the activity of alcohol dehydrogenase in hypoxic maize root tips. **Plant Physiology**, v. 89, n. 04, p. 1275-1278, 1989.

ROBERTS, J. K. M. et al. Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology**, v. 98, n. 02, p. 480-487, 1992.

- ROBERTS, J. K. M.; ANDRADE, F. H.; ANDERSON, I. C. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. **Plant Physiology**, v. 77, n. 02, p. 492-474, 2007.
- ROCHA, M. et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicas*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 03, p. 1501–1513, 2010
- SAIRAM, R. K. et al. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 03, p. 401-412, 2008.
- SENA GOMES, A. R.; KOZLOWSKI, T. T. Effects of flooding on *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus* seedlings. **Oecologia**, v. 46, n. 01, p. 139-142, 1980.
- SMIRNOFF, N.; STEWART, G. R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, v. 64, n. 02, p. 133-140, 1985.
- SODEK, L. Metabolismo do Nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. cap. 4, p. 94-113.
- SOUSA, C. A. F.; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 02, p. 83-94, 2002.
- 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. **Experimental Botany**, v. 50, n. 01, p. 1-8, 2003.
- STOIMENOVA, M. et al. The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots I. characterization of root morphology and normoxic metabolism of wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase. **Plant and Soil**, v. 253, n. 01, p. 145-53, 2003.
- STOIMENOVA, M. et al. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. **Planta**, v. 226, n. 02, p. 465-474, 2007.
- SUMMERS, J. E.; RATCLIFFE, R. G.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus* absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal Exp. Bot.**, v. 51, n. 349, p. 1413-1422, 2000.
- VAN DONGEN, J. T. et al. Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen. **Plant Physiology**, v. 131, n. 04, p. 1529–1543, 2003.
- VITAL, M. H. F. Impacto Ambiental de Florestas de Eucalipto. **Revista do BNDES**, v. 14, n. 28, p. 235-276, 2007.
- VOESENEK, L. A. C. J.; BAILEY-SERRES, J. Flooding tolerance: O₂ Sensing and Survival Strategies. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 05, p. 647–653, 2013.

VU, J.; YELENOSKY, G. Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. **Physiologia Plantarum**, v. 81, n. 01, p. 7-14, 1991.