

LUIZ EDSON MOTA DE OLIVEIRA

Professor Adjunto do Departamento de Biologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DE PLANTAS DE CANA-
DE- AÇÚCAR (SACCHARUM SP) SOB CONDIÇÕES DE
DEFICIÊNCIA HÍDRICA; ALTERAÇÕES DA ASSIMILAÇÃO
DO NITRATO E MOBILIZAÇÃO DE AÇÚCARES

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de DOUTOR
EM CIÊNCIAS.

Orientador: Prof. Dr. Antônio C. N. Magalhães

CAMPINAS/SÃO PAULO

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu pai e à minha mãe

MINHA HOMENAGEM

À minha esposa Mirlene,
ao meu filho Marcus Vanner e
à minha filha Ana Luiza, de-
dico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Programa Institucional de Capacitação de Docentes (PICD), pela oportunidade de realizar este curso.

Ao Prof. Antônio Celso Novaes Magalhães, pela orientação, apoio e incentivo durante a realização do curso.

Aos Professores Ladaslav Sodek e Enéas Gomes Filho, pelas sugestões apresentadas durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Biologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras, pela amizade e apoio durante a realização do curso.

À Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério de Indústria e Comércio, pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

Ao Instituto do Açúcar e do Alcool - PLANALSUCAR-COSUL, Araras, SP, pelo fornecimento do material vegetal.

Aos casais Bené e Dora, Carlos e Socorro, Douglas e Rita, Enéas e Albenice, Jota e Auxiliadora, Olinto e Neli, Paulinho e Rosa, Paulo Mosquim e Cristina, Sarasvate e Nina, Silas e Euza e Sodek e Elbe, pela amizade e apoio durante nossa permanência em Campinas.

Aos meus pais, minha irmã, meus sogros e meus cunhados, pelo apoio e incentivo.

À Mirlene, minha esposa, amiga e companheira, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Por fim, agradeço a todos que, de modo direto ou in direto, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO

1 - Utilização, mobilização e acumulação de sacarose..	1
2 - Interação entre o metabolismo de nitrogênio e açúcares	6
3 - Modulação do crescimento e do metabolismo de nitrato e de açúcares em condições variáveis de disponibilidade de água	8
3.1. Crescimento e expansão celular	9
3.2. Mobilização, utilização e acumulação de açúcares	10
3.3. Metabolismo de nitrato	12
3.4. Recuperação do estresse hídrico	13
4 - Objetivos	14

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Aspectos gerais	16
2 - Amostragem	18
3 - Análises enzimáticas	20
3.1. Determinação da atividade das invertases ácida e neutra, <i>in vitro</i> , de tecidos de lâmina foliar, bainha e colmo.....	20
3.1.1. Extração	20
3.1.2. Ensaio de invertases ácida e neutra ..	21

3.2. Determinação da atividade da redutase de ni trato, <i>in vivo</i> , de tecidos de lâmina foliar...	22
4 - Análises químicas	23
5 - Análises biofísicas.....	24
6 - Avaliação da recuperação do estresse hídrico	26

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Condições apropriadas de ensaio da redutase de nitrato, <i>in vivo</i> , e das invertases solúveis, <i>in vitro</i>	27
1.1. Atividade da redutase de nitrato em função da concentração de nitrato exógeno e do tempo de reação	27
1.2. Atividade da redutase de nitrato em função do pH do meio de reação	31
1.3. Atividade da redutase de nitrato em função da temperatura do meio de reação	33
1.4. Atividade da redutase de nitrato em função do estágio ontogenético da folha.....	34
1.5. Variações na atividade invertásica de teci dos de colmo e de folha ontogeneticamente diferentes em função do pH do meio de in- cubação	36
1.6. Atividade das invertases ácida e neutra em função da concentração de sacarose no meio de incubação, e em diferentes tempos de re ação	40

1.7. Atividade das invertases ácida e neutra em função da concentração do extrato proteico	40
1.8. Atividade das invertases ácida e neutra em função da temperatura do meio de reação	42
2 - Alterações bioquímicas e biofísicas associadas à deficiência hídrica em plantas nos estádios de intenso crescimento vegetativo e de amadurecimento dos colmos	44
2.1. Alterações na atividade da redutase de nitrato em função do potencial da água da folha e da taxa de transpiração	45
2.2. Alterações no potencial hídrico da folha, conteúdo de água em tecidos em crescimento e completamente expandidos e no crescimento em plantas submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação durante a fase de intenso crescimento vegetativo	46
2.3. Alterações nas atividades invertásicas e nas concentrações de carboidratos solúveis e de N-α NH ₂ em tecidos organogenticamente diferentes, de plantas submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação: fase de intenso crescimento vegetativo	61
2.3.1. Atividades das invertases ácida e neutra	61

2.3.2. Concentrações de açúcares solú- veis totais, açúcares redutores e N- α NH ₂	75
2.4. Alterações nas atividades invertásicas e nas concentrações de carboidratos so- lúveis e de N- α NH ₂ em tecidos em cres- cimento e completamente expandidos, de plantas submetidas a estresse hídrico: fase de acumulação de sacarose	94
2.4.1. Atividades das invertases ácida e neutra	94
2.4.2. Concentrações de açúcares solú- veis e de N- α NH ₂	95
IV - RESUMO	102
V - ABSTRACT	105
VI - LITERATURA CITADA	108

I - INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, devido à sua alta produtividade biológica decorrente da grande eficiência e capacidade na utilização da luz solar no processo fotossintético (ALEXANDER, 1973), representa a principal opção energética do Brasil para a substituição da importação de petróleo.

A sacarose é a matéria-prima sintetizada pela cana-de-açúcar e utilizada para consumo na alimentação e, também, para a produção de álcool etílico. A sacarose fotossintetizada nas folhas é translocada para os outros órgãos da planta onde é parcialmente utilizada nos processos que envolvem o crescimento e a manutenção da atividade celular, e o remanescente é armazenado nos colmos (VAN DILLEWIJN, 1952).

A produtividade econômica da cana-de-açúcar, representada principalmente pela sacarose, é o resultado do funcionamento dos diferentes sistemas fisiológicos modulados pelas condições do ambiente, tais como disponibilidade de nutrientes, balanço hídrico, temperatura, entre outros.

1. Utilização, mobilização e acumulação de sacarose.

A sacarose resultante da fotossimilação do CO_2 é a principal forma de açúcar translocada e armazenada nos colmos de cana-de-açúcar. O metabolismo da sacarose está estreitamente ligado com a atividade das enzimas sacarose sintetase, sacarose fosfato sintetase, fosfatase e invertases (FUTHERFORD, 1981).

A invertase (β -D-frutofuranosídeo, frutohidrolase, EC, 3.2.1.26) catalisa a hidrólise da sacarose (α -D-glicopiranosil [α -1-2]- β -D-frutofuranose) a glicose e frutose (KOSHLAND e STEIN, 1954; ALEXANDER, 1965).

Dois grupos de invertases estão presentes nos tecidos de plantas de cana-de-açúcar (GLASZIOU e BULL, 1965; GLASZIOU e GAYLER, 1972). Um grupo consiste de invertases de parede celular relacionadas com o mecanismo de translocação de sacarose do apoplasto para o simplasto (HATCH et al., 1963; HAWKER e HATCH, 1965; GLASZIOU e GAYLER, 1972; FLEISCHMACHER et al., 1980; VATTUONE et al., 1981), e o outro de invertases intracelulares solúveis envolvidas na mobilização de sacarose do vacúolo para atender a demanda metabólica da célula (HATCH et al., 1963; SAMPIETRO et al., 1980; VATTUONE et al., 1981). Em ambos os grupos de invertases tem sido demonstrado existirem dois tipos diferentes de isoenzimas: as invertases "ácida" e "neutra ou alcalina". Suas localizações e funções fisiológicas na célula tem sido examinadas, especialmente durante a fase de crescimento e maturação do colmo. GAYLER e GLASZIOU (1972) demonstraram a presença de invertase ácida insolúvel no espaço exterior, provavelmente ligada à parede celular. Constataram, também, a ocorrência de invertases ácidas solúveis no espaço exterior e no vacúolo das células do parênquima de armazenamento, cujas atividades mantem-se durante todo o processo de divisão e diferenciação celular, e decresce gradualmente com a paralização do crescimento do internódio. Aqueles autores mostraram que os tecidos maduros apresentavam atividade de invertase ácida na parede celular e de invertase neutra crescente durante o processo de maturação

dos colmos. Estes resultados também foram encontrados por outros autores (HATCH e GLASZIOU, 1963; HAWKER e HATCH, 1965; GLASZIOU e GAYLER, 1972).

Recentemente, VATTUONE et al., (1981) mostraram que, além das invertases ácidas, as paredes celulares podem apresentar atividade de invertase neutra ligada.

A análise dos mecanismos de acumulação e utilização da sacarose durante os estádios de crescimento e maturação de cana-de-açúcar tem conduzido a importantes conclusões sobre o papel fisiológico das invertases nesta planta. As invertases participam da mobilização de sacarose entre os tecidos condutores do floema e os compartimentos celulares de acumulação (SACHER et al., 1963; GLASZIOU e GAYLER, 1972; GAYLER e GLASZIOU, 1972; RICARDO, 1974). Para explicar o papel destas enzimas nos processos de acumulação de sacarose em cana-de-açúcar GLASZIOU e GAYLER (1972) propuseram o esquema representado na Figura 1. Uma invertase ácida, localizada no espaço exterior, funciona no controle da entrada de sacarose nas células parenquimatosas. Outra isoenzima ácida, localizada nos vacúolos, catalizaria a hidrólise da sacarose nos tecidos imaturos, e seria inativada durante o processo de maturação. A invertase neutra estaria localizada no compartimento metabólico representado pelo citossol, e atuaria na inversão da sacarose em tecidos maduros.

O acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar ocorre em tecidos em crescimento e em tecidos completamente expandidos. Nos tecidos em expansão este dissacarídeo é rapidamente hidrolizado pela ação da invertase ácida vacuolar, e as hexoses pro-

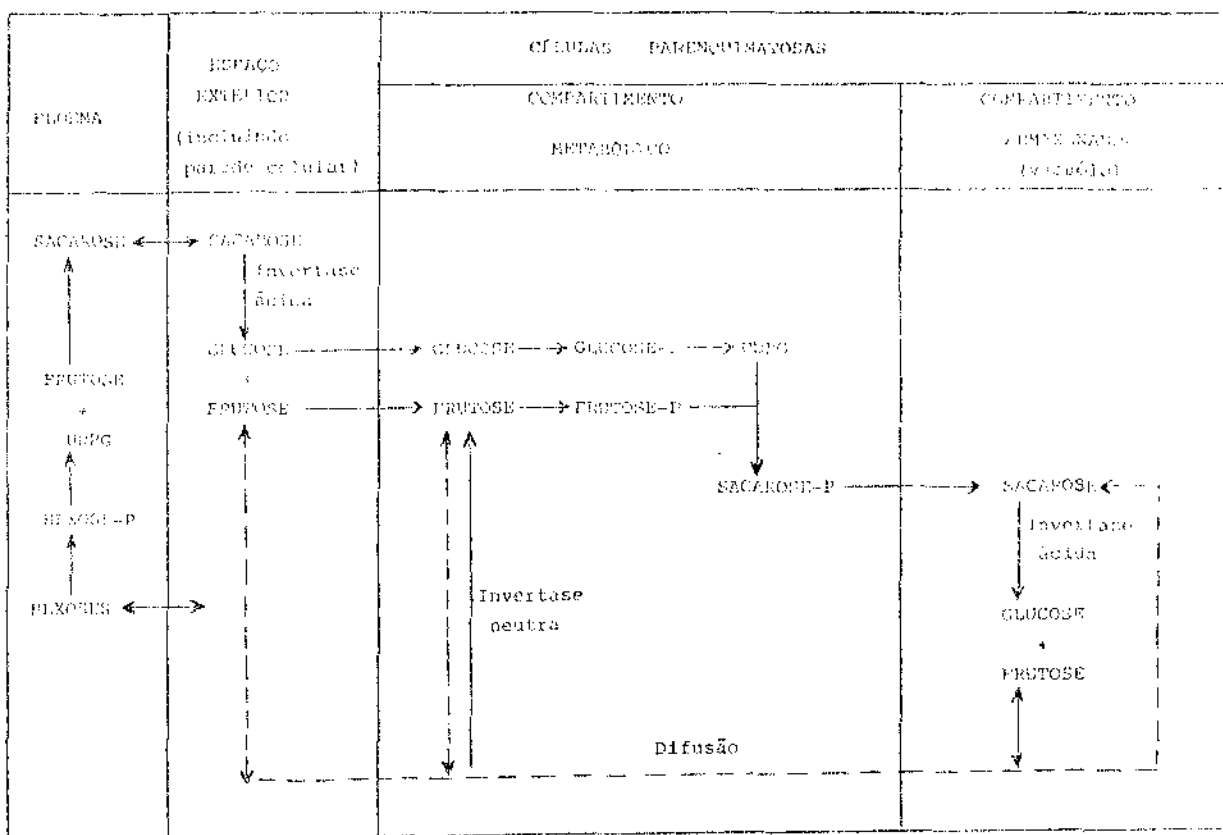


FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo de acumulação de açúcares nos tecidos do nervo da cauda-de-apêndice (adaptado de GLASSICO e CAYLER, 1972).

duzidas são utilizadas no citoplasma durante os processos que resultam no crescimento (SACHER *et al.*, 1963; GLASZIOU e BULL, 1965; GAYLER e GLASZIOU, 1972).

A alta atividade da invertase ácida está associada com o alongamento celular em muitos tecidos, como por exemplo, em internódios de cana-de-açúcar (HATCH e GLASZIOU, 1963; GLASZIOU e BULL, 1965), raízes de cenoura (RICARDO e REES, 1970), radícula de milho (HELLEBUST E FORWARD, 1962) e em folhas de joio (POLLOCK e LLOYD, 1977) e de aveia (GREENLAND e LEWIS, 1981). Em tecidos de raiz e nos internódios de cana-de-açúcar, é frequente observar-se uma queda na atividade da invertase ácida nas regiões onde o crescimento cessou, e um aumento concomitante na atividade da invertase neutra (RICARDO e REES, 1970; LYNE e REES, 1971). Atingida a maturidade, estes tecidos armazenam considerável quantidade de sacarose, sendo que a reação catalizada pela invertase neutra citoplasmática fornece hexoses para as necessidades metabólicas da célula, permitindo a acumulação de sacarose no vacúolo (GAYLER e GLASZIOU, 1972; RICARDO, 1974).

A correlação existente entre a atividade da invertase ácida e a taxa de alongamento celular em plantas de cana-de-açúcar (HATCH e GLASZIOU, 1963; GLASZIOU e BULL, 1965) sugere que a baixa atividade dessa enzima pode ser um fator limitante do crescimento e, conseqüentemente, da produtividade econômica.

2. Interação entre o metabolismo de nitrogênio e açúcares.

O nitrogênio desempenha um papel chave no crescimento e produtividade das plantas, constituindo-se em componente fundamental das proteínas e ácidos nucleicos, e participante direta ou indiretamente de importantes processos bioquímicos e metabólicos das células. O nitrogênio é absorvido quase que totalmente na forma de íon nitrato, que é reduzido à amônia e posteriormente assimilado em aminoácidos (MAGALHÃES, 1975). Tem sido proposto que a transformação de nitrato até aminoácidos é controlada pela atividade da redutase de nitrato devido a ela ser: a) a primeira enzima no caminho metabólico; b) relativamente instável tanto *in vivo* como *in vitro*, e especialmente sensível quando submetida à condições extremas de disponibilidade de água e temperatura (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

O processo de redução de nitrato nas plantas está estreitamente relacionado com o metabolismo de açúcares (ALEXANDER, 1965; MAGALHÃES, 1975; NEYRA e HAGEMAN, 1978; SILVEIRA, 1980), como é mostrado no esquema da Figura 2, proposto por NEYRA e HAGEMAN (1978) para folhas de milho. Em cana-de-açúcar, tem sido demonstrado que plantas deficientes em nitrogênio acumulam açúcares nas folhas (ALEXANDER, 1965; HARTT, 1970; SILVEIRA, 1980) e reduzem a fixação de CO₂ (HARTT, 1970).

A redução de nitrato é um processo que, além de depender de energia metabólica, consome esqueletos de carbono provenientes dos açúcares. Assim, parece provável que variedades de cana-de-açúcar que apresentam alta capacidade de re-

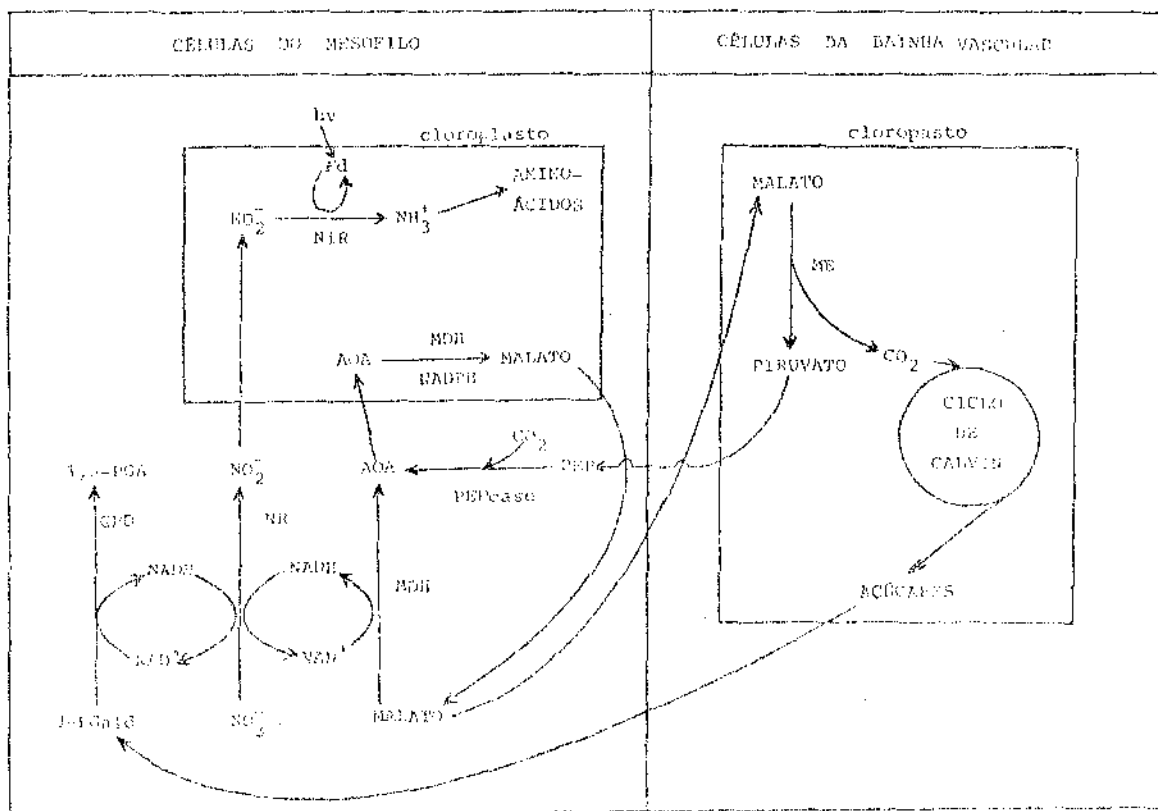


FIGURA 2 - Representação esquemática da integração entre a assimilação de nitrato e a síntese de açúcares (adaptado de HEYNS e BAGIMAN, 1972). (NR) - Redutase de nitrato; (NADH) - Dehidrogenase de nitrato; (MDH) - Desidrogenase do malato; (ME) - Enzima malica; (PEPC) - Descarboxilase do Glicialdeído 3-fosfato; (PDC) - Fosfoenolpiruvato carboxilase.

dução de nitrato venham a acumular menos açúcares e mais nitrogênio alfa-amino solúvel nas folhas (ROSARIO e SOOKSATHAN, 1977). Esta hipótese é reforçada por BARTA (1975), que verificou em *Lolium perene* cultivado em baixos níveis de nitrato, um acúmulo de açúcares solúveis nas folhas e baixo teor de $N-\alpha NH_2$.

3. Modulação do crescimento e do metabolismo de nitrato e de açúcares em condições variáveis de disponibilidade de água.

A baixa disponibilidade de água no solo influencia sensivelmente as características anatômicas e morfológicas e os processos fisiológicos e bioquímicos relacionados com o crescimento das plantas. O grau de injúria causado pelo estresse hídrico depende, em considerável extensão, da variedade, estágio de desenvolvimento e também do órgão da planta considerado. Em cana-de-açúcar vários estudos demonstram que a redução da disponibilidade de água no solo afeta negativamente o crescimento e a produção (ROBINSON, 1963; SHAW e INNES, 1965; TANIMOTO e NICKELL, 1965; HUDSON, 1968; MONGELARD, 1968; GOSNELL e LONSDALE, 1974; BRINHOLI, 1975; SINGH e REDDY, 1980; KOEHLER et al., 1982; NAIDU et al., 1983; VIQUEIRA et al., 1983; SANTOS FILHO, 1985). No entanto, a literatura demonstra que há uma grande carência de informações básicas relacionadas aos aspectos metabólicos da assimilação de nitrogênio e aos mecanismos de utilização, mobilização e acumulação de açúcares em cana-de-açúcar, associados ao crescimento de plantas cultivadas sob condições adversas de disponibilidade de água no solo.

3.1. Crescimento e expansão celular.

Um dos processos fisiológicos mais sensíveis ao déficit hídrico é a expansão celular (BOYER, 1970b; HSIAO, 1973; BOYER, 1976). O alongamento celular pode ser reduzido sob a influência de baixos níveis de dessecação, geralmente antes da fotossíntese ser afetada (BOYER, 1970b; HSIAO, 1973). Considerando que as células meristemáticas necessitam atingir um tamanho mínimo para desencadear o início do processo de divisão, HSIAO (1973) levantou a hipótese de que o efeito do estresse hídrico sobre a divisão celular, como verificado por vários autores (KIRKHAM et al., 1972; MEYER e BOYER, 1972; Mc CREE e DAVIS, 1974), pode ser indireto, através da supressão do alongamento celular.

As taxas de alongamento celular são determinadas pelas propriedades da parede das células e da pressão de turgescência (HSIAO, 1973). A manutenção do alongamento celular de uma planta depende primariamente do estabelecimento de um potencial de turgescência superior ao módulo de elasticidade do tecido em expansão e, posteriormente, da disponibilidade de matéria-prima (carboidratos, aminoácidos) para a incorporação em constituintes celulares. A acumulação de solutos osmoticamente ativos nas regiões de crescimento é responsável pela geração de um gradiente de potencial hídrico decorrente da diminuição no potencial osmótico, e, conseqüentemente, pela manutenção do fluxo de água que determinará a turgescência e o alongamento celular nestas regiões (ACEVEDO et al., 1979; MUNNS, et al., 1979; MICHELENA e BOYER, 1982; WESTGATE e BOYER, 1984).

3.2. Mobilização, utilização e acumulação de açúcares.

O efeito do estresse hídrico sobre a translocação de assimilados pode ser decorrente dos efeitos da dessecação sobre a fonte produtora e os sítios de utilização de metabólitos e, também, sobre os sistemas biofísicos e bioquímicos que controlam o processo de translocação *per se* (HSIAO, 1973).

O efeito depressivo do estresse hídrico sobre a translocação de fotoassimilados tem sido constatado em cana-de-açúcar (HARTT e KORTSCHAK, 1962; HARTT, 1967) e em outras plantas (WIEB e WIHRHEIM, 1962; ZHOLKEVICH, 1954 e ROBERTS, 1964 apud HARTT, 1967; WARDLAW, 1967; MUNNS *et al.*, 1979). HARTT (1967) e GOSNELL e LONSDALE (1974) verificaram que a suspensão da irrigação das plantas de cana-de-açúcar durante a fase de amadurecimento causou um aumento do armazenamento de sacarose nos colmos. Segundo HARTT (1967), a não ser que o estresse hídrico seja muito severo, nenhum outro argumento fisiológico poderia ser contrário à interrupção da irrigação como uma prática benéfica para a maturação da cana-de-açúcar.

A correlação existente entre as atividades das invertases solúveis e os processos de mobilização, utilização e acúmulo de açúcares permite concluir que quaisquer alterações nas atividades invertásicas provocadas pelo estresse hídrico poderão resultar em modificações na translocação de sacarose e subsequente utilização para o crescimento da planta ou armazenamento nos órgãos de reserva. Tem sido mencionado na literatura que o estresse hídrico aumenta a atividade das invertases em tecidos foliares de algodão (VIEIRA DA SILVA, 1973) e dendê (ADJAIHOSSOU, 1983), e em tecidos do colmo de cana-de-açúcar em fase de maturação (HATCH e GLASZIOU, 1963). Por ou-

tro lado, tem sido mostrado que a atividade da invertase ácida diminui com a imposição do estresse hídrico nos tecidos em crescimento de colmo de cana-de-açúcar (HATCH e GLASZIOU, 1963) e em folhas de milho e feijão (HAWKER e WALKER, 1978; HAWKER, 1980). Segundo VIEIRA DA SILVA (1970) e ADJAHOSSOU (1983) os aumentos nas atividades invertásicas durante o processo de senescência induzido pela deficiência hídrica podem resultar em efeitos benéficos, promovendo uma diminuição no potencial osmótico dos tecidos.

Apesar da importância das invertases, não há estudos comparativos entre as diversas partes da planta de cana-de-açúcar em seus diferentes estádios ontogenéticos. Estas enzimas variam de acordo com a fisiologia de cada órgão, e podem se constituir em indicadores valiosos na determinação de alterações provocadas nos processos de crescimento e diferenciação celular induzidas por condições ambientais adversas.

Tem sido observado em várias plantas, inclusive em cana-de-açúcar, que o estresse hídrico induz um aumento na concentração de substâncias com propriedades osmóticas, sugerindo um provável ajustamento osmótico no tecido (HSIAO, 1973; ROSSIELO *et al.*, 1981; TURNER e BEGG, 1981; KOENLER, *et al.*, 1982). Dentre os solutos acumulados o potássio, os aminoácidos livres, e especialmente os açúcares, representam a principal porção (MUNNS *et al.*, 1979). Durante o estabelecimento do déficit hídrico, o ajuste osmótico que ocorre nas regiões em crescimento e em tecidos foliares maduros, parece desempenhar um papel importante na manutenção da turgescência celular, essencial para a continuidade dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos relacionados com o crescimento (HSIAO,

1973; MUNNS et al., 1979; ACKERSON e HEBERT, 1981; KOEHLER et al., 1982).

3.3. Metabolismo de nitrato.

Dentre os fatores ambientais que interferem com a atividade da redutase de nitrato destaca-se a disponibilidade de água no solo (MATTAS e PAULI, 1965; HUFFAKER et al., 1970; BARDZIK et al., 1971; PLAUT, 1973, 1974; MORILLA et al., 1973; SHANER e BOYER, 1976b; MEGURO e MAGALHÃES, 1983). Esta enzima pode ser utilizada como um bom indicador bioquímico do estado fisiológico de plantas submetidas a condições de estresse hídrico. Tem sido estabelecido que a reação catalizada pela redutase de nitrato é o passo regulador da incorporação do nitrogênio mineral em compostos orgânicos e, conseqüentemente, de importantes processos que controlam o crescimento da planta (MAGALHÃES, 1975). Muitos investigadores postulam que o substrato da reação (NO_3^-) é o indutor primário da atividade da redutase de nitrato (BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

O efeito depressivo do estresse hídrico sobre a atividade da redutase de nitrato tem sido atribuído a um aumento da taxa de degradação da enzima ou a um decréscimo na taxa de síntese de proteína (BARNET NAYLOR, 1966; BENZIONI e HELBER, 1977; NAYLOR, 1972; TODD, 1972; MORILLA et al., 1973). Por outro lado, SHANER e BOYER (1976a, 1976b) mostraram que a atividade da enzima pode ser regulada, também, pelo fluxo de nitrato das raízes para as folhas.

Em cana-de-açúcar existem poucas informações na li-

teratura sobre a atividade da redutase de nitrato, e a metodologia utilizada para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, empregam técnicas desenvolvidas para outras espécies.

VIQUEIRA et al., (1983), estudando o efeito da deficiência hídrica em duas variedades de cana-de-açúcar, uma sensível e outra tolerante, encontraram um decréscimo logarítmico na atividade da redutase de nitrato com a diminuição no conteúdo relativo de água nas folhas. Aqueles autores não observaram, nas variedades estudadas, qualquer relação entre a tolerância ao estresse hídrico e a atividade da enzima. Outros estudos realizados com a redutase de nitrato em cana-de-açúcar se referem à indução da atividade da enzima pelo nitrato, em folhas, raízes e colmos (MAREZKI e DELA CRUZ, 1967), às interações entre potássio e nitrogênio com o processo de redução do nitrato (SILVEIRA, 1980), ou à atividade enzimática nas fases vegetativa e reprodutiva da planta (CHIRANJIVIRAO e VIJAYASARADHY, 1980). Existem, também, alguns trabalhos mostrando a importância da nutrição de nitrato sobre a atividade da redutase de nitrato e, conseqüentemente, sobre a produção de cana-de-açúcar (PARTHASARATHI e RAMAKRISHNAN, 1964; PARTHASARATHI, 1966; ROSARIO e SOOKSATHAN, 1977).

3.4. Recuperação do estresse hídrico.

A irreversibilidade das alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas provocadas pelo estresse hídrico depende do genótipo, duração e severidade do estresse e estágio de desenvolvimento da planta.

A avaliação da recuperação de plantas previamente es tressadas tem sido realizada, principalmente, através de parâmetros biofísicos, tais como, potencial hídrico da folha e resistência estomática (GLOVER, 1959; FISCHER et al., 1970; BOYER, 1971a, 1971b; BRUNINI, 1980; ANGELOCCI, 1983; SANTOS FILHO, 1985). Entretanto, a recuperação da fotossíntese que normalmente ocorre paralelamente à da resistência estomática (TROUGHTON, 1969; BOYER, 1971a; FRANK et al., 1973; BTELORAI e HOPMANS, 1975) e da expansão celular (BOYER 1970b; ACEVEDO et al., 1971; SANTOS FILHO, 1985), têm sido também utilizadas como indicadores da recuperação de plantas previamente submetidas ao déficit hídrico.

A avaliação da recuperação de plantas submetidas ao estresse hídrico não tem sido utilizada como um parâmetro indicativo da resistência à seca, em plantas de cana-de-açúcar. Porém, quando utilizada, resume-se somente aos aspectos biofísicos (SANTOS FILHO, 1985), não considerando os aspectos metabólicos relacionados com os processos de crescimento e de mobilização, utilização e acumulação de açúcares.

4. Objetivos.

O propósito deste trabalho foi o de determinar as atividades da redutase de nitrato e das invertases ácida e neutra em plantas de cana-de-açúcar submetidas às condições limitantes de disponibilidade de água, associando-as com o crescimento, translocação, utilização e acumulação de açúcares. Objetivou-se, também, estabelecer as inter-relações entre o pro

cesso de redução do nitrato e o fluxo deste ânion na planta. Em adição, a investigação objetivou o estudo dos padrões de recuperação da turgescência e do crescimento das plantas após a remoção da restrição hídrica imposta.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Aspectos gerais.

O material vegetal utilizado neste trabalho foi obtido no Instituto do Açúcar e do Alcool - PLANALSUCAR-COSUL-ARARAS-SP.

Foram realizados dois experimentos, sendo um utilizando-se plantas de três variedades de cana-de-açúcar (NA 56-79, IAC 51-205 e CB 41-76), em fase de intenso crescimento vegetativo, e com aproximadamente dois meses de idade. BRINUOLI (1975), com base em resultados experimentais da variabilidade genética para a resistência à seca em condições normais de cultivo, caracterizou as variedades NA 56-79, IAC 51-205 e CB 41-76 como sendo, resistente, moderadamente resistente e suscetível, respectivamente, à baixa disponibilidade de água no solo. Este experimento foi realizado em casa-de-vegetação, utilizando-se plantas cultivadas em vasos contendo 10 Kg de substrato constituído de 75% de solo e 25% de areia. O outro experimento foi realizado com plantas da variedade NA 56-79 durante a fase de acumulação de sacarose (maturação do colmo) e com cerca de 10 meses de idade. As plantas utilizadas neste experimento foram cultivadas em vasos contendo 120 Kg do mesmo substrato citado anteriormente, em casa-de-vegetação especialmente construída para comportar o crescimento em altura dessas plantas.

A adubação da mistura solo/areia foi realizada de acordo com o resultado de análise de fertilidade, e consistiu

de 170 g de Salitre do Chile, 250 g de Superfosfato Simples e de 100 g de Cloreto de Potássio para cada 100 litros de substrato. No experimento destinado aos estudos com plantas na fase de acumulação de sacarose, foram adicionadas mais 200 g de Salitre do Chile por vaso, aplicadas em cobertura em 3 parcelas e antes da indução do déficit hídrico.

As plantas utilizadas nos dois experimentos foram obtidas a partir de toletes com uma gema, retirados da parte média dos colmos e colhidos de plantas-mãe com 12 meses de idade. Após o corte dos toletes foram selecionados os mais uniformes quanto ao comprimento e diâmetro, os quais foram plantados em número de três e cinco, respectivamente, para os experimentos com plantas em fases de intenso crescimento vegetativo e de acumulação de sacarose. Quando as plantas atingiram um mês de idade foram eliminadas as menos vigorosas e desuniformes deixando-se duas e três plantas, respectivamente, nos experimentos destinados aos estudos nas fases de intenso crescimento vegetativo e de acumulação de sacarose.

As plantas foram irrigadas pelo menos uma vez por dia até que o substrato atingisse teor de umidade próximo à capacidade de campo. Quando as plantas atingiram a idade fisiológica pretendida em cada experimento, foram separados dois grupos de plantas, um mantendo-se a irrigação normal (controle) e outro suprimindo-se a irrigação, correspondendo ao tratamento de deficiência hídrica. A recuperação do estresse hídrico foi avaliada após a reirrigação das plantas previamente estressadas, somente no experimento realizado com plantas em fase de intenso crescimento vegetativo.

Os parâmetros que determinaram os efeitos da restrição hídrica imposta e da reirrigação foram estimados durante o período de indução da deficiência hídrica e da recuperação nas plantas em fase de intenso crescimento vegetativo. Entretanto, nas plantas em estágio de maturação de colmos, as avaliações foram realizadas somente no final do período de estresse hídrico. O efeito do estresse hídrico na atividade da redutase de nitrato foi determinado apenas na variedade NA 56-79, em fase de acumulação de sacarose, durante todo o período de indução da deficiência hídrica.

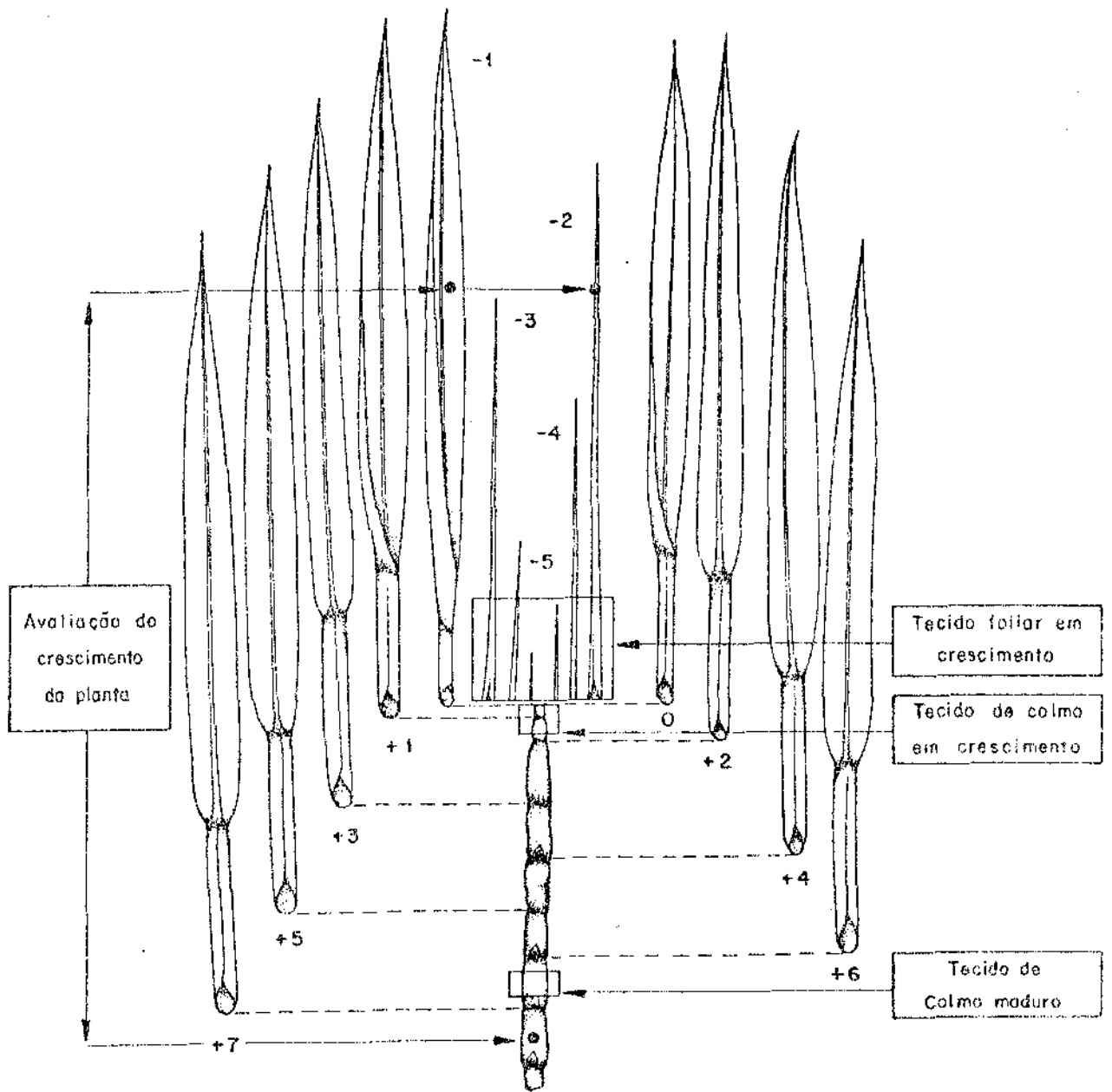
2. Amostragem.

Os critérios utilizados para as amostragens dos diferentes órgãos e tecidos destinados às análises enzimáticas, químicas e biofísicas são ilustrados pela Figura 3.

Para as análises das atividades invertásicas em tecidos completamente expandidos de lâmina foliar e de bainha, as amostragens foram realizadas na folha+2, e em tecidos de colmo maduro no internódio correspondente à folha+7. As amostras de tecidos em crescimento de colmo e lâmina foliar foram coletadas nas regiões dos meristemas intercalares da porção apical do colmo e basal das folhas mais jovens (folhas-2, -3, -4, -5 e etc) do cartucho foliar.

A atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, foi analisada em tecidos de lâmina foliar correspondente à folha+3.

As determinações químicas da avaliação do conteúdo de água foram realizadas em amostras coletadas conforme mencionado anteriormente para as análises das atividades invertásicas.



3. Análises Enzimáticas.

3.1. Determinação da atividade das invertases ácida e neutra, *in vitro*, de tecidos de lâmina foliar, bainha e colmo.

3.1.1. Extração

A extração enzimática foi feita utilizando-se amostras de tecidos completamente expandidos e em crescimento de lâmina foliar e colmo, além de tecidos de bainha completamente expandidos, segundo o método descrito por PRADO et al., (1979), com algumas modificações. Os tecidos foram subdivididos em pequenos pedaços e homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5, contendo 2-mercaptoetanol, 1 mM, e $MnSO_4$, 5 μM . A homogeneização dos tecidos foi realizada em homogeneizador Polytron PT 35 durante 15 segundos, por três vezes seguidas. Ensaio preliminares mostraram que este tipo de homogeneização é mais eficiente e rápido na extração de invertases, principalmente nos tecidos fibrosos de folhas e colmos maduros. Em seguida, o homogenado foi filtrado sob pressão manual em quatro camadas de gaze e centrifugado a 18 000 g durante 20 minutos. O precipitado foi descartado e um volume predeterminado da fração sobrenadante foi adicionado sobre igual volume de solução de sulfato de amônio, saturada à temperatura de 30°C, e previamente resfriado à 4°C. Após um período de 15 horas de precipitação salina o material foi submetido a uma centrifugação a 18 000 g durante 20 minutos. Os precipitados proteicos de lâminas foliares e colmos em crescimento, e de bainhas e lâminas foliares completamente expandidas, foram ressuspensos na proporção de um mililitro de solução ex

tratora por grama de tecido fresco. Entretanto, para tecidos de colmos maduros, o precipitado foi ressuspenso em solução extratora na proporção de um mililitro de solução para três gramas de tecido. Todas as fases de extração foram realizadas em temperatura de 4°C.

3.1.2. Ensaio de invertases ácida e neutra

As atividades enzimáticas foram determinadas em meio de reação (4,0 ml) constituído de extrato enzimático, sacarose em tampão fosfato ou acetato de potássio 0,2 M, no pH de reação indicado para cada isoenzima. Os tampões foram preparados segundo VATTUONE *et al.*, (1981).

Na primeira fase do experimento foram determinadas as condições apropriadas de ensaio das invertases, tais como: (a) pH do meio de reação em função da ontogenia do tecido, (b) concentração de sacarose e tempo de reação, (c) alíquota de extrato enzimático, e (d) temperatura do meio de incubação. Informações adicionais sobre a metodologia adotada na determinação das condições apropriadas de ensaio estão incluídas no texto e nas legendas das próprias figuras. Resultados destas determinações, no capítulo resultados e discussão.

As atividades invertásicas foram avaliadas pela dosagem de açúcares redutores produzidos, segundo o método do 2,4-dinitrosalicilato descrito por MILLER (1959). As atividades foram expressas em μmol de açúcares redutores (AR) produzidos, por grama de matéria fresca ou seca por hora.

3.2. Determinação da atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, de tecidos de lâmina foliar.

A atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, foi avaliada, segundo o método descrito por MEGURO e MAGALHÃES (1983), com modificações nas condições de ensaio visando a maximização da atividade em tecidos foliares de cana-de-açúcar.

Lâminas foliares sem a nervura central foram subdivididas, transversalmente, em segmentos de aproximadamente 3 mm e colocadas em recipientes contendo solução-tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5. Posteriormente, amostras de 500 mg de tecido foliar segmentado foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 ml de meio de incubação, constituído de fosfato de potássio 0,1 M, nitrato de potássio e 1% de n-propa-nol.

Preliminarmente, foram determinadas as condições mais apropriadas de ensaio enzimático, tais como: (a) concentração de nitrato e tempo de reação, (b) pH e temperatura do meio de incubação e (c) estágio ontogenético da folha amostrada. Como no caso das invertases, as legendas das figuras e tabelas resultantes das determinações das condições apropriadas de ensaio, fornecem informações metodológicas adicionais.

As amostras de tecido foliar foram mantidas submersas no meio de incubação através de um suporte plástico revestido com tela de nylon, e submetidas à infiltração a vácuo durante dois minutos. O ar foi reintroduzido rapidamente e o procedimento repetido. Os frascos de vidro contendo as amostras foram incubados em banho-maria com agitação e no escuro.

Ao final de cada tempo de reação foram retiradas alíquotas para a determinação da quantidade de nitrito formado. Em cada alíquota foram adicionados 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, 1 ml de N-2-naftil etilenodiamino diHCl 0,02% e água destilada para completar 4 ml de volume final. As absorvâncias foram determinadas a 540 nm, e a atividade expressa em μ moles de nitrito produzido por grama de peso fresco ou seco, por hora.

4. Análises químicas.

As determinações químicas foram realizadas em amostras retiradas dos extratos brutos destinados às análises de atividades invertásicas, antes de serem submetidas à precipitação proteica com sulfato de amônio.

As concentrações de açúcares redutores, açúcares solúveis totais e nitrogênio alfa-amino ($N-\alpha NH_2$) foram dosadas pelos métodos de dinitrosalicilato (MILLER, 1959), de antrona (YEMM e WILLIS, 1954) e de ninhidrina (YEMM e COCKING, 1955), respectivamente. A diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores forneceu uma estimativa do conteúdo de sacarose apenas no experimento com plantas em fase de acumulação de sacarose, porém com uma grande variabilidade nas repetições, conforme foi verificado também nos resultados de SUZUKI, (1982) e VIEIRA (1983).

5. Análises biofísicas.

As determinações do potencial da água da folha e do conteúdo de água foram realizadas segundo as recomendações técnicas de TURNER (1981). O potencial hídrico da folha+3 foi estimado pelo método da Bomba de Pressão (SCHOLANDER et al., 1965), através de equipamento fabricado por Soil Moisture Equipment Corp., USA, modelo 3 000. Segundo PASSIOURA (1980) a Bomba de Pressão estima o potencial matricial da água no apoplasto ou parede celular sendo análoga ao Aparelho de Membrana de Pressão usada em física do solo. Como o potencial osmótico da água apoplástica é frequentemente próximo de zero (BOYER, 1967, 1969) o potencial matricial do apoplasto será semelhante ao potencial da água da folha. Resultados preliminares mostraram não existir diferenças entre os valores de potencial hídrico das folhas+2 e +3.

As folhas destinadas às determinações do potencial hídrico, foram envolvidas em papel alumínio, segundos antes de serem destacadas da planta. Imediatamente após o corte, as folhas foram colocadas dentro de uma caixa de isopor resfriada, com gelo. Estas precauções associadas à rapidez na determinação do potencial hídrico pela Bomba de Pressão foram tomadas para prevenir alterações no estado de hidratação da folha, principalmente decorrente da perda evapotranspiratória da água da lâmina foliar.

Os conteúdos de água (CA) dos tecidos em crescimento e completamente expandidos foram determinados em duplicatas das amostras utilizadas para as análises enzimáticas e químicas através da expressão: $CA = 100 \cdot PS/PF$; onde PF e PS são

respectivamente, os pesos do tecido fresco e seco a 80°C.

A taxa de transpiração foi avaliada pelo porômetro de equilíbrio dinâmico, LI-COR modelo LI-1600 fabricado pela Lambda Instruments Corp., USA. Esta determinação, e a estimativa do potencial hídrico da folha foram realizadas na folha +3, no período do dia compreendido entre 11:00 e 13:00 horas. Nesta mesma folha é que foi avaliada a atividade da redutase de nitrato.

O crescimento foliar foi estimado medindo-se, diariamente, a altura entre um ponto de referência marcado com caneta com tinta indelével, na base da planta e outro assinalado no limbo das folhas-1 ou -2, conforme indicado na Figura 1. Este método permite determinar as alterações no crescimento da planta, especialmente das folhas mais jovens do cartucho foliar, decorrentes de variações nas condições ambientais, que raramente seriam detectadas utilizando-se os métodos convencionais de análise de crescimento.

Com base nos resultados do crescimento foliar avaliado diariamente, determinou-se a taxa de crescimento relativo foliar (TCRF) através da expressão:

$TCRF = (\ln A_2 - \ln A_1) / (t_2 - t_1)$, segundo FISHER (1921) apud HUNT (1978); onde, A_1 representa o acréscimo no crescimento em altura (cm) no tempo 1, e A_2 representa o acréscimo na altura no tempo 2. O intervalo entre as avaliações ($t_2 - t_1$) foi de um dia.

Através de avaliações realizadas por KULJPER (1943) apud VAN DILLEWIJN (1952), e confirmadas por ensaios preliminares, constatou-se que as folhas jovens (folha-1 e as duas

vens) do cartucho foliar comportam-se como um único órgão, crescendo sincronizadamente, apresentando curvas de crescimento simétricas e não possuindo nenhuma discriminação entre as lâminas e as bainhas destas folhas.

6. Avaliação da recuperação do estresse hídrico.

A reidratação das plantas previamente estressadas deu-se no quinto e no sétimo dia de estresse hídrico, respectivamente, para os experimentos com plantas em fase de intenso crescimento vegetativo e em fase de maturação de colmos.

As avaliações da recuperação das plantas em estado de acumulação de sacarose, restringiram-se apenas às observações visuais. Entretanto, no experimento com plantas em estágio de intenso desenvolvimento vegetativo, a recuperação das plantas previamente estressadas foi acompanhada, periodicamente, pelos mesmos parâmetros bioquímicos e biofísicos determinados durante o período de indução da deficiência hídrica. Nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos, a recuperação foi avaliada somente através do potencial hídrico da folha, pois, no final do período de indução do déficit, apresentaram a maioria de sua área foliar com sintomas visíveis de irreversibilidade do estresse hídrico.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Condições apropriadas de ensaio da redutase de nitrato, *in vivo*, e das Invertases solúveis, *in vitro*.

1.1. Atividade da redutase de nitrato em função da concentração de nitrato exógeno e do tempo de reação.

Observa-se pelas Figuras 4A e 4B que concentrações de nitrato no meio de reação superiores a 50 mM induziram uma queda na atividade da redutase de nitrato, sendo que os maiores decréscimos foram observados na variedade NA 56-79. A inibição na taxa de redução de nitrato provocada pelo aumento da concentração salina no meio de reação já tinha sido observada em variedades de cana-de-açúcar (ROSARIO e SOOKSATHAN, 1977), em cotilédones de rabanete (BEEVERS *et al.*, 1965), e em plantas de soja (TINGEY *et al.*, 1974), de café (MEGIRO e MACIELLES, 1982) e de Aguapó (RUSSO, 1983).

Com o propósito de estudar a inibição do processo de indução da atividade da redutase de nitrato por altas concentrações de KNO_3 (Figura 4A e 4B), a atividade da enzima foi determinada em três meios de reação contendo: (a) baixa concentração de KNO_3 (50 mM e $-0,26$ MPa de Ψ_s), (b) alta concentração de KNO_3 (300 mM e $-1,53$ MPa de Ψ_s) e (c) baixa concentração de KNO_3 e adição de manitol para o decréscimo do potencial osmótico até o valor correspondente ao meio com alta concentração salina, isto é, $-1,53$ MPa. Como pode ser observado pela Tabela I, a inibição no processo de redução de nitrato

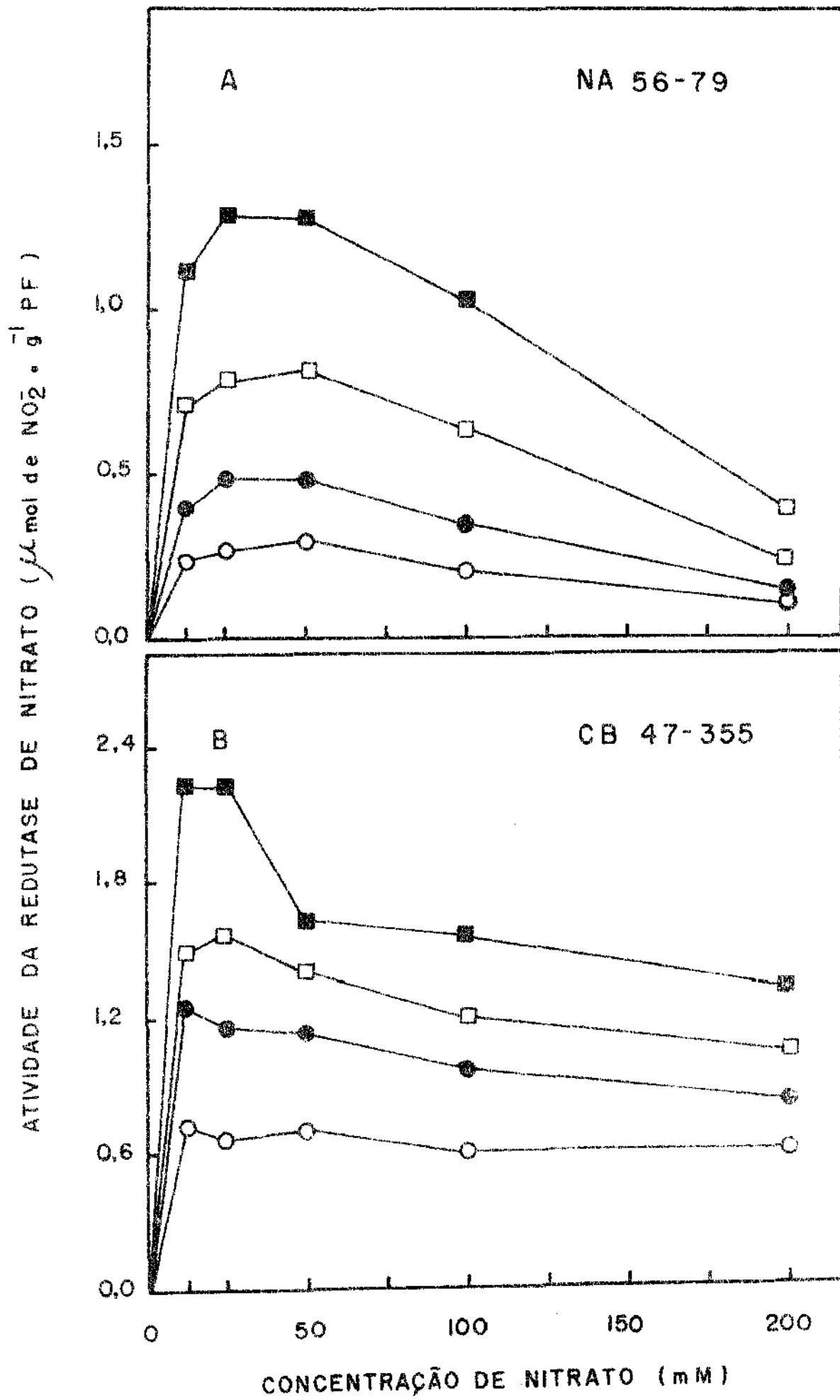


TABELA 1 - Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, na variedade NA 56-79, em função do potencial osmótico do meio de reação obtido com KNO_3 e Manitol. As condições de ensaio foram as mesmas indicadas na legenda da Figura 4, exceto a retirada de alíquotas que foi feita aos 15 e 75 minutos de reação. Média de três repetições.

Tratamento osmótico	Potencial osmótico (-MPa)	Redutase de Nitrato ($\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$)
KNO_3 (50 mM)	0,26	1,37a
KNO_3 (300 mM)	1,53	0,51b
KNO_3 (50 mM) + Manitol	1,53	1,29a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

parece não ser decorrente da diminuição do potencial osmótico do meio de reação, pois não se observou qualquer alteração significativa na atividade da enzima quando se abaixou o potencial osmótico do meio contendo 50 mM de KNO_3 com a adição de Manitol. Estes resultados sugerem que a inativação da enzima poderia estar associada à alta força iônica desenvolvida no compartimento celular onde está localizada a redutase de nitrato, causando uma desestabilização no complexo de subunidades que compõe a molécula proteica. Esta hipótese é reforçada por resultados obtidos por outros autores, que verificaram uma inibição da atividade da redutase de nitrato, *in vitro*, quando foram adicionados sais de NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Cl^- e SO_4^{2-} no meio de ensaio (SCHRADER, 1978 apud ASLAM *et al.*, 1984; ASLAM *et al.*, 1984). Outra possível explicação para a diminuição da redução de nitrato por altas concentrações de KNO_3 (300 mM), consiste na inibição da absorção de NO_3^- pelo K^+ , como sugere ASLAM *et al.*, (1984).

Nos experimentos realizados não foi observada qualquer atividade da redutase de nitrato quando os tecidos foliares foram ensaiados em meio de reação sem nitrato exógeno. (Figuras 4A e 4B). Isto sugere a carência de nitrato no sítio metabólico responsável pela redução e/ou a ausência do influxo deste íon do compartimento armazenador para o sítio metabólico (BEEVERS *et al.*, 1965), uma vez que não foi possível detectar níveis de NO_3^- nas lâminas foliares, pelo método de CATALDO *et al.*, (1975), (resultados não apresentados). O pequeno efeito da adição de n-propanol no meio de reação, como indutor de permeabilidade de membrana, e a forte correlação entre a atividade da redutase de nitrato e o fluxo de nitrato na corrente transpiratória (Figura 9), sugerem que o fluxo de

não continha um reservatório significativo de nitrato nas células.

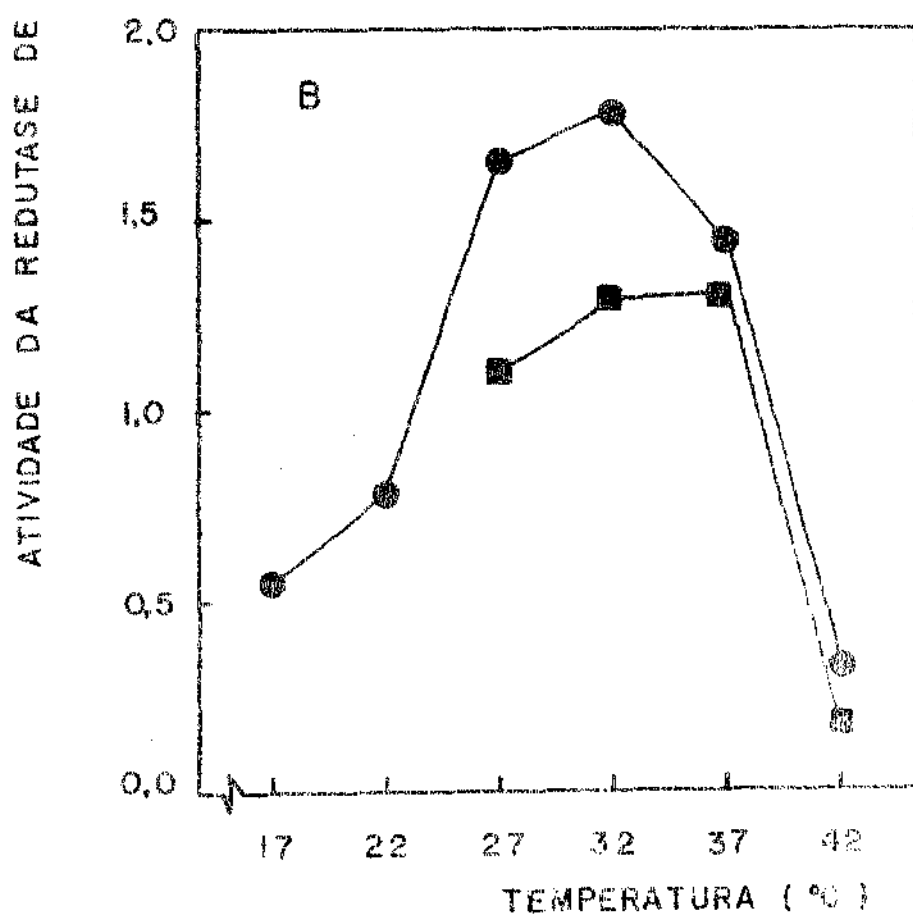
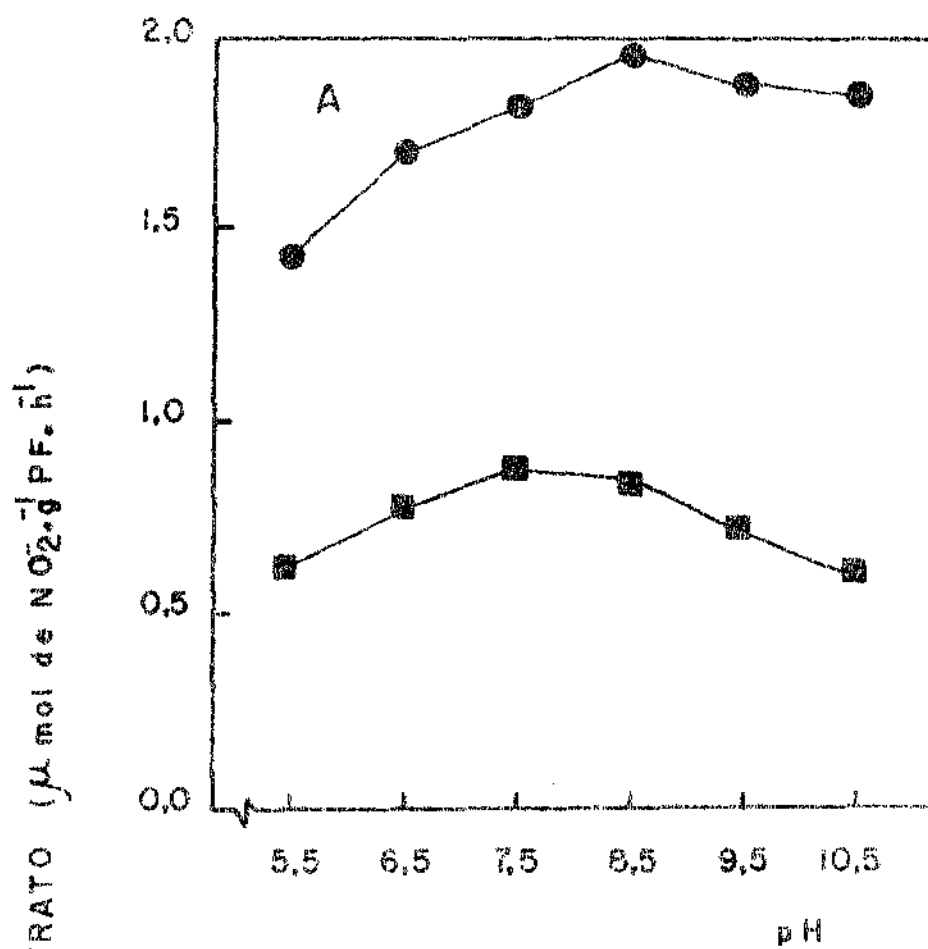
Como pode ser observado pelas Figuras 4A e 4B, o intervalo de 60 minutos entre a retirada das alíquotas (15 e 75 minutos de reação) foi estabelecido como o mais apropriado para a determinação da concentração de nitrato no meio de reação.

Os experimentos permitiram estabelecer a concentração de 50 mM de KNO_3 no meio de incubação, e o intervalo de reação entre 15 e 75 minutos, para os procedimentos posteriores de determinação da atividade da redutase de nitrato.

1.2. Atividade da redutase de nitrato em função do pH do meio de reação.

Os resultados apresentados na figura 5A mostram que as tendências de maiores atividades da redutase de nitrato foram alcançadas nos pHs 7,5 e 8,5, respectivamente, para as variedades CB 47-355 e NA 56-79, embora, nestes pHs, a diferença na atividade enzimática nas duas variedades, não tenha sido estatisticamente significativa. O efeito do pH do meio de reação na atividade da redutase de nitrato é variável entre as diferentes espécies e variedades de plantas (MEGURO e MAGALHÃES, 1982; RUSSO, 1983). Os resultados dos experimentos realizados permitiram a escolha de pH 7,5 para as determinações posteriores.

Os efeitos do pH no processo de redução de nitrato a nitrito, *in vivo*, parecem estar relacionados com a permeabilidade de membranas e também com o fluxo de nitrato e nitrito



nos tecidos utilizados. PRAKASH e NAIK (1982) verificaram que os valores de pH, variando de 3,0 a 7,5, durante a infiltração e incubação, não tiveram efeito marcante na atividade da redutase de nitrato de discos foliares de plantas de trigo, embora em pHs ácidos tenham constatado um menor efluxo de nitrito do interior dos tecidos para o meio de reação que em pHs alcalinos. A razão das células foliares serem incapazes de absorver ou reter nitrito em pH alcalino não está esclarecida. Estes autores, e RAVEN e SMITH (1980), sugeriram que o pH citoplasmático é pouco influenciado pelas alterações no pH extracelular. Entretanto, BASSIONI (1971) sugere que, em pH alcalino, os íons OH^- competem com o nitrato impedindo o seu influxo ao interior da célula, e que em pH muito ácido pode ocorrer dano no tecido.

1.3. Atividade da redutase de nitrato em função da temperatura do meio de reação.

Verifica-se, pela Figura 5B, que a taxa máxima de redução de nitrato a nitrito foi determinada nas temperaturas de 32°C, para a variedade NA 56-79, e entre 32 a 37°C, para a variedade CB 47-355. Em temperaturas inferiores e superiores a estes valores, observou-se um decréscimo acentuado na atividade enzimática. Em função destes resultados, a temperatura de 32°C foi utilizada nos experimentos posteriores. A queda na capacidade de redução de nitrato nas temperaturas extremas (17, 22 e 42°C) pode ser atribuída às alterações induzidas na permeabilidade das membranas, decrescendo a absorção e o trans

porte de nitrato para os sítios de redução no interior das células (BASSIONI, 1971; MAGALHÃES *et al.*, 1976; BENZONI e HEIMER, 1977; HALLMARK e HUFFAKER, 1978; MAGALHÃES e HAGEMAN, 1978). Segundo MAGALHÃES *et al.*, (1976), BENZONI e HEIMER (1977) e SANTORO (1979) a inibição da atividade da redutase de nitrato em temperaturas elevadas pode também ser devida à alteração conformacional da molécula da enzima, tornando-a inativa.

1.4. Atividade da redutase de nitrato em função do estágio ontogenético da folha.

Neste estudo foram utilizadas plantas com três meses de idade, e a amostragem de tecidos foliares foi realizada nas folhas 0, +1, +2, +3, +4 e +5, segundo classificação feita por KUIJPER (1915) apud VAN DILLEWIJN (1952), conforme mostra a Figura 3.

Nota-se pela Tabela II que a atividade da redutase de nitrato atingiu seu valor máximo nas folhas +3, +4 e +5 (folhas completamente expandidas). Observa-se, também, que a atividade de nitrato a nitrito decresceu progressivamente da folha +5 para a folha 0 (folha encartuchada e em crescimento). Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos em diferentes espécies de plantas, inclusive em variedades de cana-de-açúcar, que mostram baixa atividade em tecidos foliares em expansão e valores máximos em tecidos quase que completamente expandidos (MATTAS e PAULI, 1965; HARPER e HAGEMAN, 1972; CARELLI, 1979; MEGURO e MAGALHÃES, 1982; PAHL e CARELLI, 1984). As variações na atividade da redutase de nitrato observadas nas lâminas fo-

TABELA II - Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, em função do estágio ontogenético da lâmina foliar de plantas de cana-de-açúcar, variedade NA 56-79, com três meses de idade. As condições de ensaio foram aquelas estabelecidas anteriormente. Média de três repetições.

Folha	Redutase de Nitrato ($\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$)
0	0,67 d
+1	0,76 cd
+2	1,55 bc
+3	1,70 ab
+4	2,10 a
+5	2,05 a

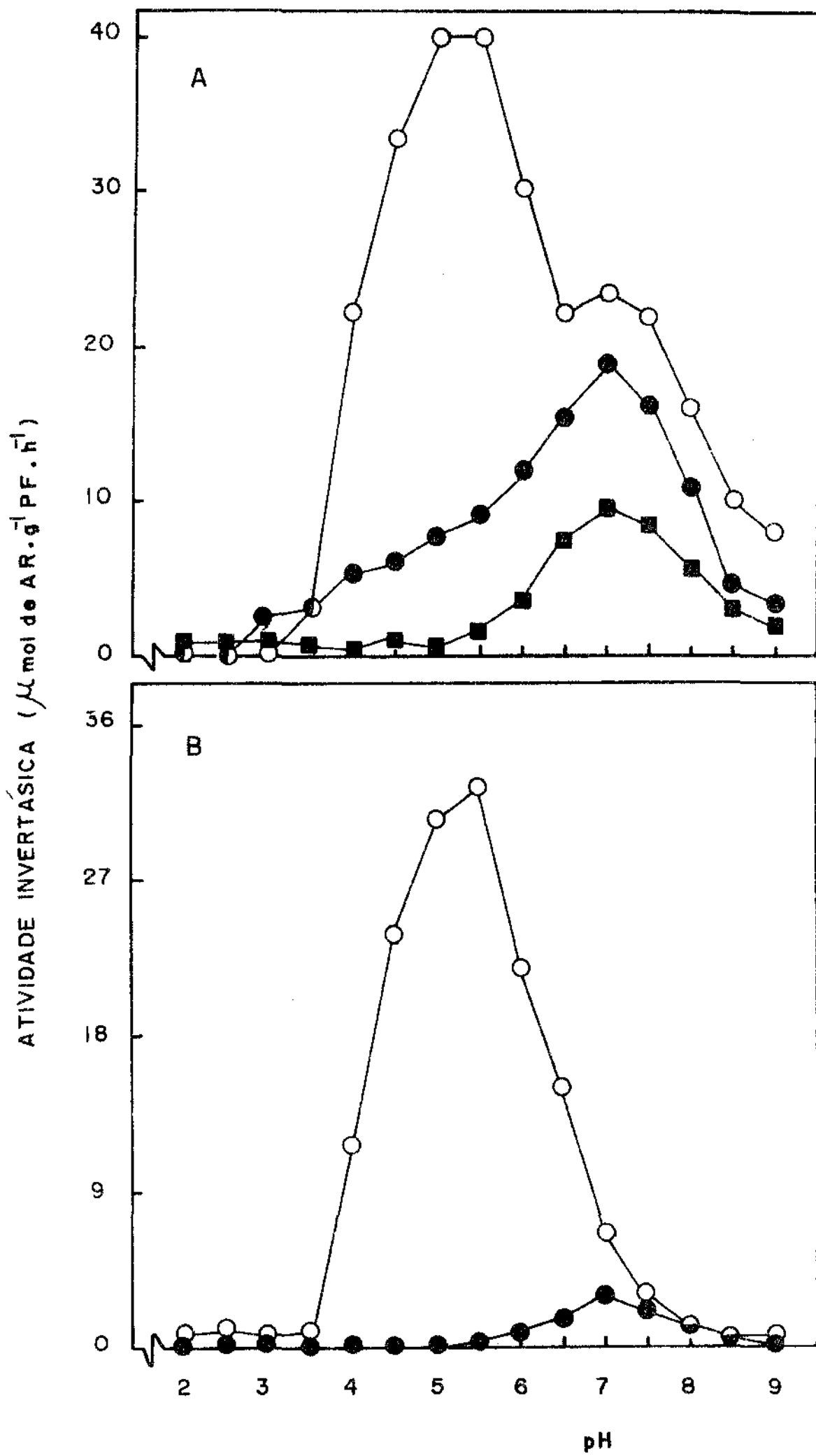
As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

liares de diferentes idades fisiológicas podem estar correlacionadas com as diferenças na capacidade de síntese de proteína e/ou de fixação de CO_2 dos tecidos. (WALLACE e PATE, 1965; KANNANGARA e WOOLHOUSE, 1967; JORDAN e HUFFAKER, 1972; SRIVASTAVA, 1975; FAHL e CARELLI, 1984).

Com base nos resultados apresentados na Tabela II, e considerando-se que tecidos fisiologicamente ativos, com suficiente capacidade para a fixação do CO_2 e síntese de proteína, apresentam maior atividade da redutase de nitrato (MEGURO e MACALHÃES, 1982; FAHL e CARELLI, 1984), a folha+3 foi preferencialmente escolhida para os estudos posteriores envolvendo os efeitos da disponibilidade de água no solo sobre a redução de nitrato a nitrito.

1.5. Variações na atividade invertásica de tecidos de colmo e de folha ontogeneticamente diferentes em função do pH do meio de incubação.

Os resultados apresentados nas Figuras 6A e 6B permitem a caracterização de duas isoenzimas de invertase nos tecidos das plantas de cana-de-açúcar, variedade NA 56-79. Uma isoenzima ácida com máxima atividade em pH 5,5, e predominante em tecidos em crescimento, e outra neutra com um máximo de atividade em pH 7,0, e com predominância em tecidos completamente expandidos. Comparativamente, a superioridade da atividade da isoenzima ácida sobre a neutra, nos tecidos de lâmina foliar e de colmo em expansão, foi de aproximadamente 1,7 e 5,0 vezes, respectivamente. Entretanto, observou-se que, nos tecidos fisiologicamente mais diferenciados, a atividade in-



vertásica ácida decresceu acentuadamente em cerca de 80% nas lâminas foliares (Figura 6A), e em praticamente 99% nos colmos (Figura 6B). Por outro lado, a queda na atividade da enzima neutra nos tecidos completamente expandidos foi muito menor, atingindo valores de aproximadamente 60 e 20% nos colmos e lâminas foliares, respectivamente.

A invertase ácida solúvel está localizada tanto no vacúolo como no espaço exterior, e a invertase neutra solúvel é uma isoenzima citoplasmática (GAYLER e GLASZIOU, 1972; GLASZIOU e GAYLER, 1972).

As altas atividades da invertase ácida parecem estar associadas com as regiões de divisão e alongamento celular, como foi verificado em internódios de cana-se-açúcar (HATCH e GLASZIOU, 1963; GLASZIOU e BULL, 1965), raízes de cenoura (RICARDO e REES, 1970), radícula de milho (HELLEBUST e FORWARD, 1962) e em folhas de joio (POLLOCK e LLOYD, 1977) e de aveia (GREENLAND e LEWIS, 1981). A maior atividade da invertase ácida verificada nos tecidos de lâminas foliares e de colmos em crescimento pode ser atribuída à grande demanda de monossacarídeos nos processos biossintéticos das regiões meristemáticas, durante a fase de crescimento (SACHER et al., 1963; GAYLER e GLASZIOU, 1972). Estas considerações do papel da invertase ácida solúvel sobre os processos de crescimento celular são reforçadas pelos decréscimos acentuados observados na atividade enzimática quando os tecidos estudados tornaram-se fisiologicamente mais diferenciados.

A predominância da atividade invertásica neutra nos tecidos fisiologicamente mais desenvolvidos, e sua atividade

em tecidos em expansão, sugerem o envolvimento desta enzima na acumulação de sacarose no vacúolo, como já mencionado por ALEXANDER, (1973). Segundo aquele autor, a invertase neutra opera em conjunto com a invertase ácida da parede celular, controlando a acumulação ativa de sacarose no vacúolo.

A capacidade de um tecido em armazenar sacarose nos vacúolos parece depender, dentre outros aspectos, do tipo de órgão da planta e de seu estágio ontogenético. Parece incontestável que nos colmos maduros de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições apropriadas de ambiente, o armazenamento se dá de forma praticamente irreversível, visto que a atividade da invertase ácida vacuolar naquele tecido, é praticamente inexistente (Figura 6B), conforme já foi verificado por vários autores (HATCH e GLASZIOU, 1963; GLASZIOU e GAYLER, 1972; ALEXANDER, 1973). Entretanto, a presença da enzima ácida nos tecidos de folhas completamente expandidos, especialmente nas lâminas foliares (Figura 6A), indica que a sacarose fotossintetizada e armazenada nos vacúolos pode ser metabolizada produzindo monossacarídeos, os quais serão utilizados na manutenção do metabolismo da própria folha e/ou exportados para outros órgãos da planta, principalmente os colmos. Ainda que a atividade das invertases tenha sido constatada em folhas de cana (HATCH et al., 1963; PRADO et al., 1979; SAMPIETRO et al., 1980) muito pouca atenção tem sido dada à elucidação de suas funções fisiológicas.

Baseando-se nas curvas de pH (Figuras 6A e 6B), pode-se inferir que cada tecido tem uma atividade invertásica com um pH ótimo bem definido, e que as regiões da curva com menores atividades podem representar a sobreposição de ativi

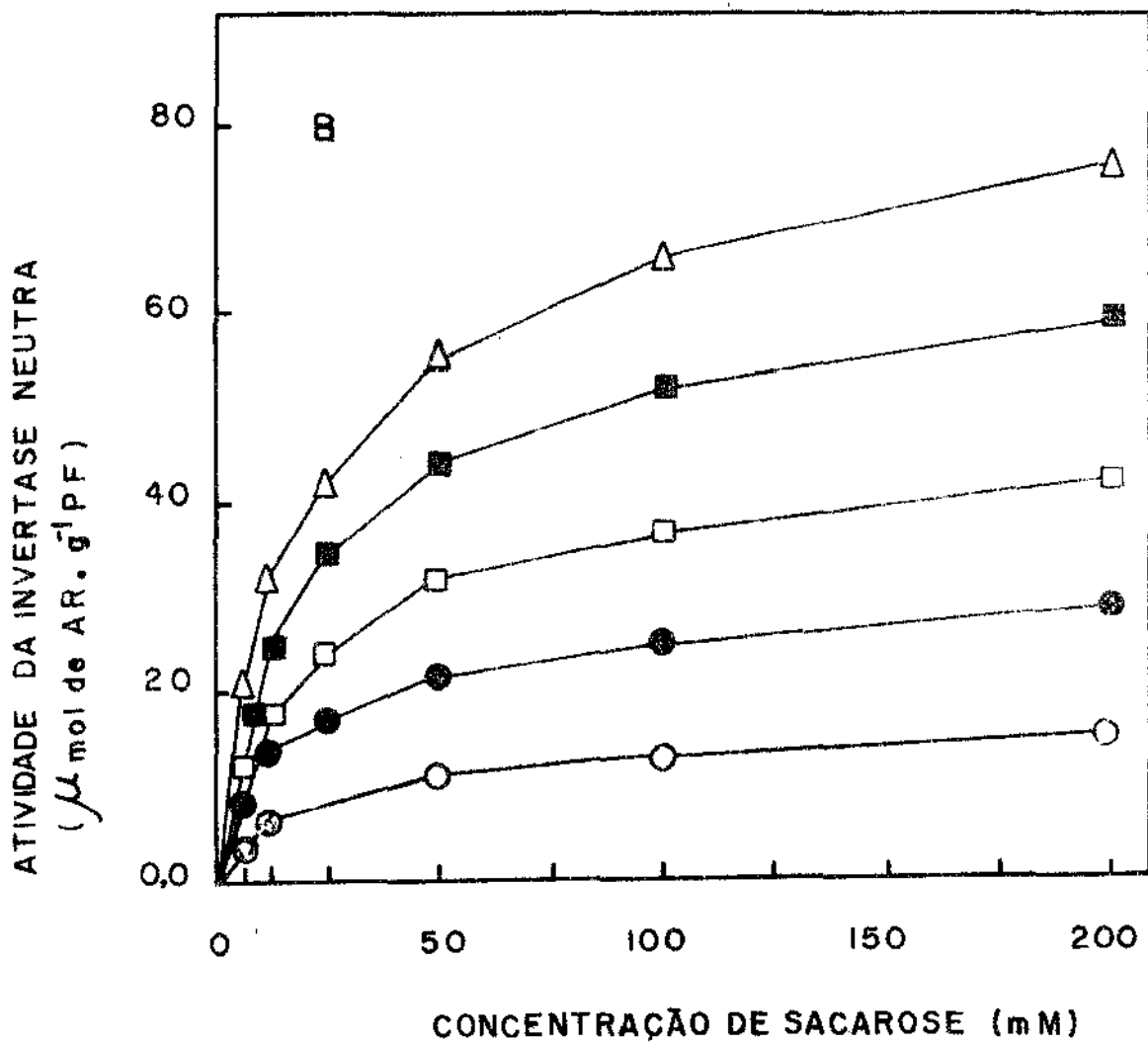
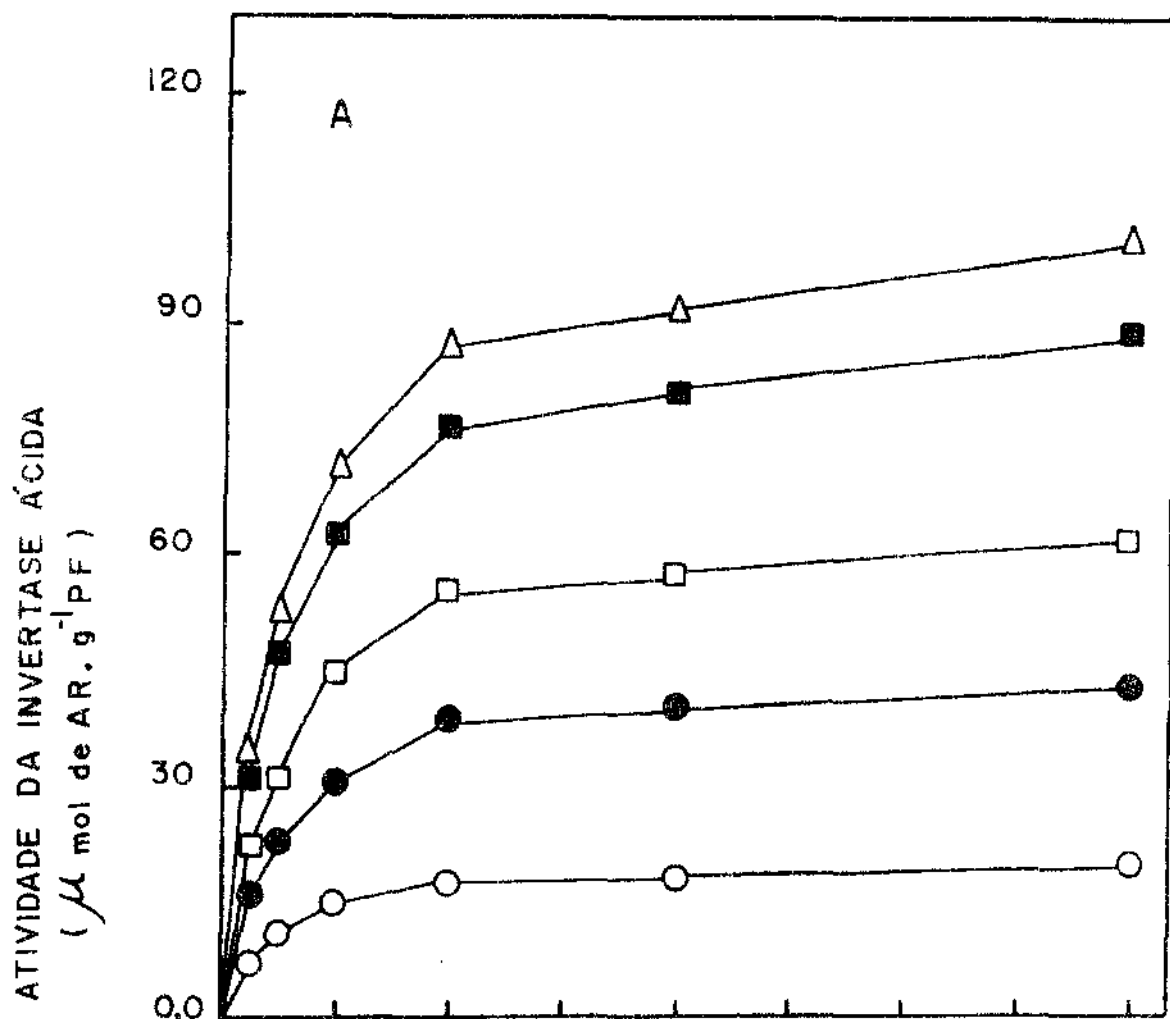
dade de várias invertases (FLEISCHMACHER et al., 1980). Estes resultados confirmam aqueles obtidos por SAMPIETRO et al., (1980) e FLEISCHMACHER et al., (1980), mostrando que as invertases podem variar com o tipo e idade fisiológica do tecido, o que reforça a importância da utilização destas isoenzimas como um parâmetro discriminatório do comportamento das plantas sob condições extremas de disponibilidade de água.

1.6. Atividade das invertases ácida e neutra em função da concentração de sacarose no meio de incubação e em diferentes tempos de reação.

Nota-se pelas Figuras 7A e 7B que as atividades enzimáticas aumentaram rapidamente até a concentração de sacarose de 50 mM, para a invertase ácida, e 100 mM para a invertase neutra, tendendo à estabilização em 200 mM. Pode ser observado também que os tempos de reação de 120 minutos, para a invertase ácida (Figura 7A), e de 150 minutos para a invertase neutra (Figura 7B), foram os mais apropriados para o ensaio dessas isoenzimas, devido à linearidade apresentada na reação de hidrólise enzimática da sacarose. Em função destes resultados decidiu-se pela utilização de 100 mM de sacarose no meio de incubação e o intervalo de reação entre 5 e 125 minutos, para os experimentos posteriores de determinação das atividades invertásicas ácida e neutra.

1.7. Atividade das invertases ácida e neutra em função da concentração do extrato proteico.

Este ensaio foi realizado com propósito de se estabe

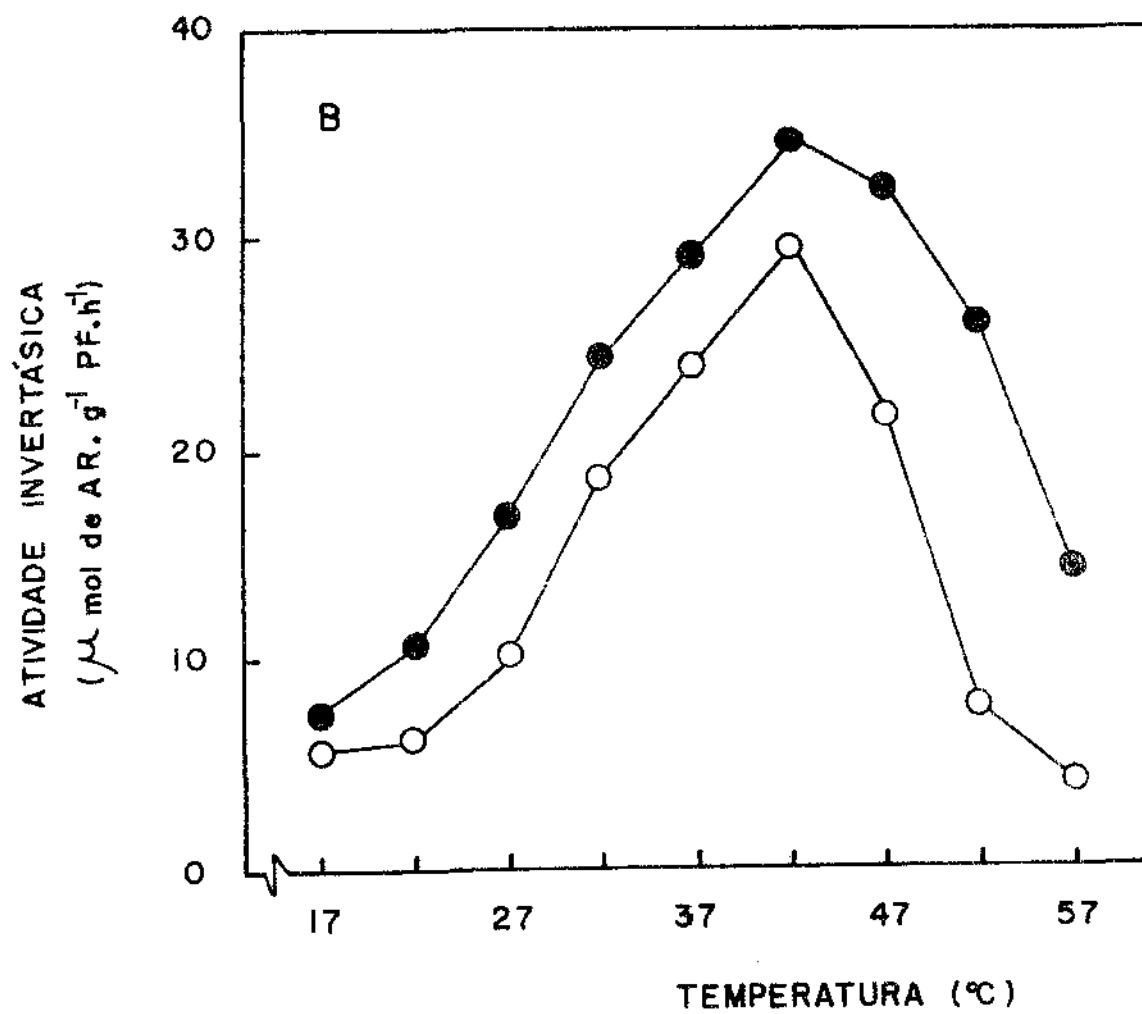
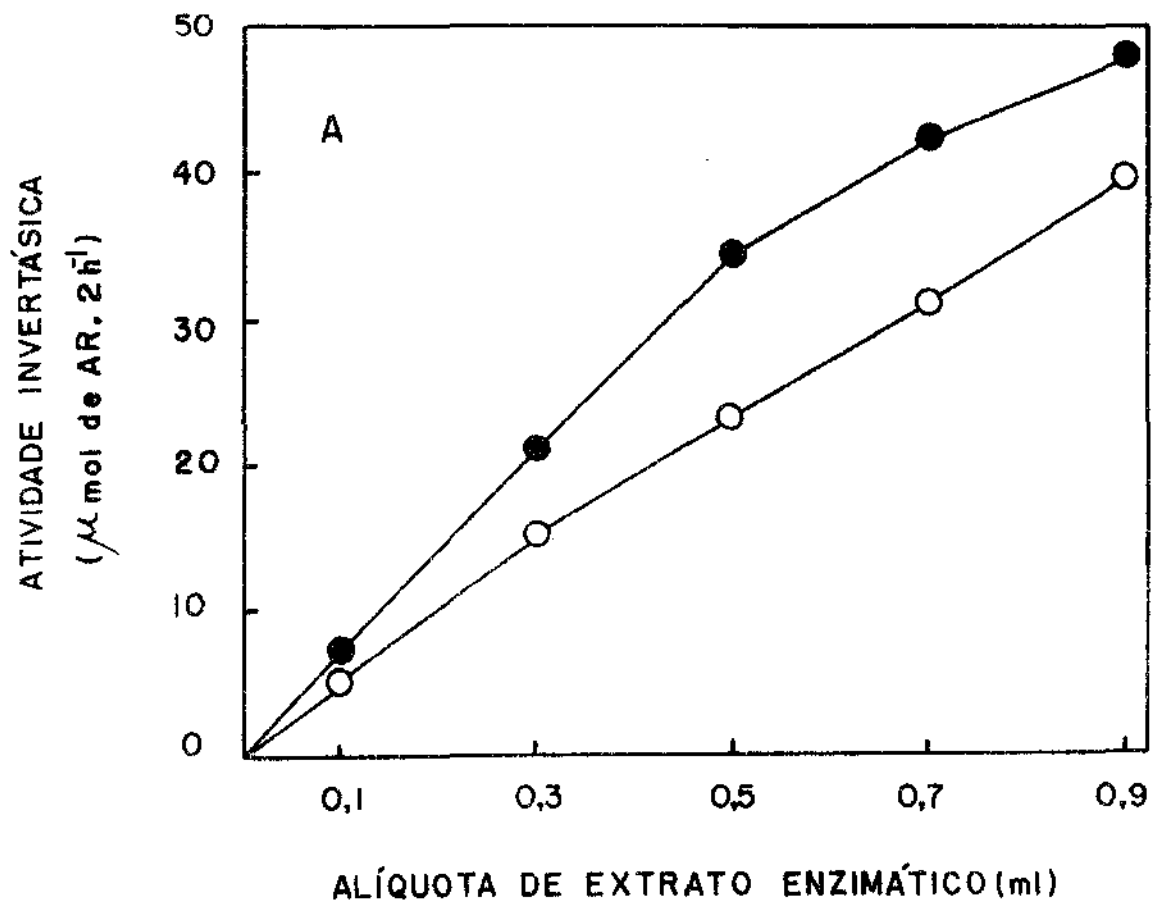


lecer o volume da alíquota do extrato proteico a ser utilizado na determinação da atividade enzimática em tecidos em expansão e completamente expandidos.

Observa-se pela Figura 8A uma relação linear entre o volume da alíquota utilizada e a reação de hidrólise da sacarose até 0,5 ml ($35 \mu\text{mol de AR} \cdot 2\text{h}^{-1}$), para a invertase neutra, e pelo menos até 0,9 ml ($40 \mu\text{mol de AR} \cdot 2\text{h}^{-1}$), para a invertase ácida. Estes resultados indicam que, para aquelas concentrações de enzima no meio de reação (fase linear da curva), a concentração de 100 mM de sacarose utilizada nos ensaios foi suficiente para manter a atividade máxima das enzimas. Foram utilizadas alíquotas de 0,5 ml de extrato enzimático nos ensaios subsequentes.

1.8. Atividade das invertases ácida e neutra em função da temperatura do meio de reação.

Verifica-se pela Figura 8B que a máxima capacidade hidrolítica das invertases estudadas foi alcançada na temperatura de 42°C . A tolerância das invertases à temperaturas mais altas, pode ser devido à proteção da molécula enzimática exercida pelo seu próprio substrato. Acima e abaixo desta temperatura, observa-se uma queda acentuada na atividade das invertases que atingiu a 57°C , cerca de 50% do valor máximo, para a invertase neutra e de 10%, para a invertase ácida. A 17°C , as atividades invertásicas atingiram cerca de 20% de seus valores máximos. A queda na atividade em temperaturas superiores a 42°C pode ser interpretada como devido a alterações na estrutura conformacional da enzima que, segundo SAMPIETRO *et al.* (1980), parece ser muito complexa.



Com base nestes resultados, a temperatura de 40°C foi utilizada nos ensaios enzimáticos posteriores.

Os efeitos da temperatura ambiente no crescimento, florescimento e produção de açúcar de plantas de cana-de-açúcar (VAN DILLEWIJN, 1952) parecem estar associados, pelo menos em parte, com a sensibilidade das invertases a temperaturas extremas (HATCH e GLASZIOU, 1963), visto que estas enzimas estão envolvidas nos processos de mobilização de sacarose e sua subsequente utilização para o crescimento ou armazenamento nos compartimentos de reserva (SACHER *et al.*, 1963). Entretanto, não existem informações na literatura sobre o efeito da temperatura nas atividades invertásicas associadas aos processos de florescimento e de "isoporização".

2. Alterações bioquímicas e biofísicas associadas à deficiência hídrica em plantas nos estádios de intenso crescimento vegetativo e de amadurecimento dos colmos.

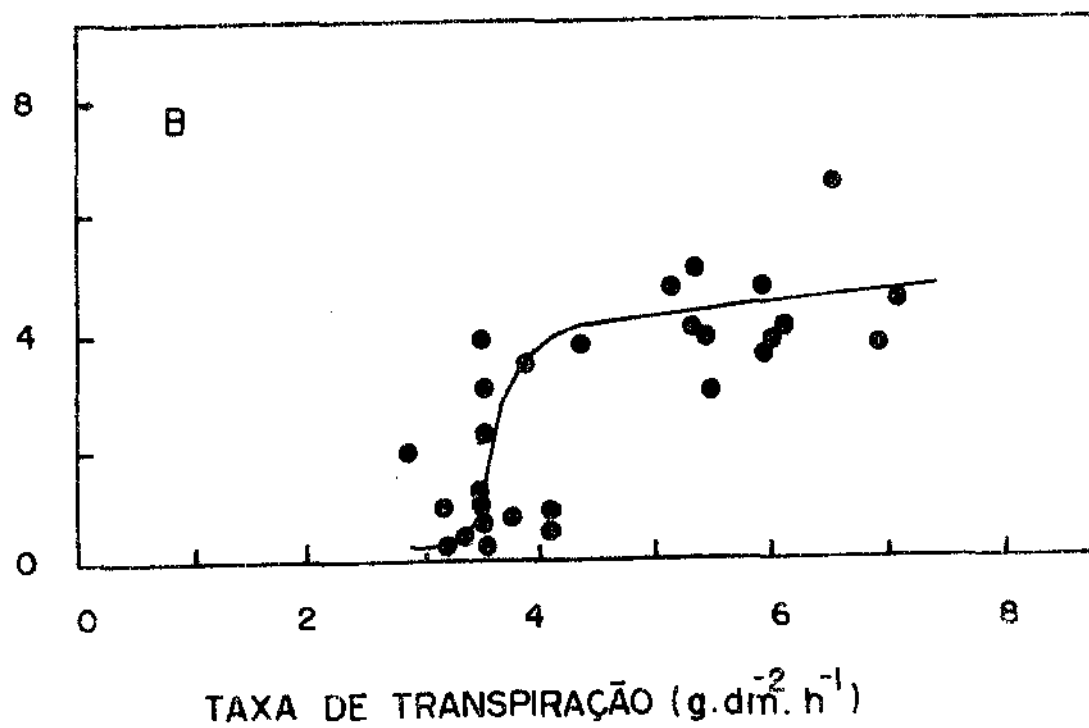
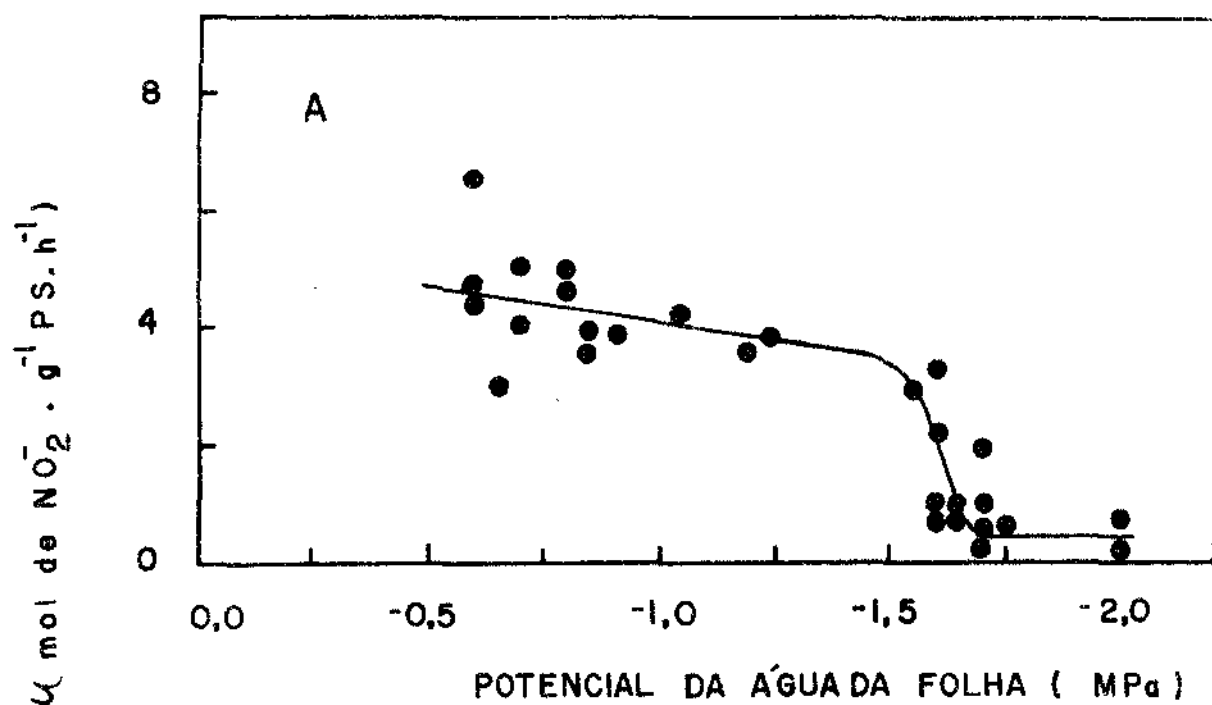
Os estudos sobre o efeito do estresse hídrico em plantas na fase de intenso crescimento vegetativo foram realizados utilizando as variedades CB 41-76, NA 56-79 e IAC 51-205, enquanto que nos experimentos com plantas no estágio de amadurecimento dos colmos (acumulação de sacarose) foi utilizada a variedade NA 56-79. Foram selecionadas plantas com aproximadamente dois e dez meses de idade, respectivamente, para os estudos envolvendo os estádios de intenso crescimento vegetativo e de acumulação de sacarose. A recuperação das plantas previamente estressadas foi avaliada apenas naquelas em fase de

intenso crescimento vegetativo.

2.1. Alterações na atividade da redutase de nitrato em função do potencial da água da folha e da taxa de transpiração.

Observa-se pela Figura 9 A, que a diminuição do potencial hídrico da folha, na faixa de -0,5 a -1,5 MPa, provocou um decréscimo suave e linear na atividade da redutase de nitrato de aproximadamente 30% do valor máximo observado em potencial hídrico de aproximadamente -0,5 MPa. Entretanto, na faixa de potencial da água entre -1,5 e -1,7 MPa a atividade da enzima foi reduzida drasticamente.

Quanto às alterações na redução do nitrato provocadas pelas variações na taxa de transpiração, (Figura 9 B) observou-se um comportamento semelhante àquele relatado para as variações no potencial da água na folha (Figura 9 A). Assim, a atividade da redutase de nitrato caiu abruptamente quando a taxa de transpiração decresceu em aproximadamente $1 \text{ g. dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (queda de 4 para $3 \text{ g. dm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$). Estas semelhanças observadas parecem estar associadas ao efeito correlativo existente entre o potencial da água da folha e a taxa de transpiração, conforme foi demonstrado por SANTOS FILHO, (1985) na mesma variedade e idêntica condição experimental. As quedas abruptas na redução do nitrato observadas nas faixas de potencial da água da folha e de taxa de transpiração induzidas experimentalmente coincidem com a grande elevação da resistência difusiva estomática (de $1,5$ para $4,0 \text{ s. cm}^{-1}$) determinada nestas mesmas



condições por SANTOS FILHO (1985).

O efeito depressivo de baixos potenciais da água na atividade da redutase de nitrato pode estar associado ao decréscimo na taxa de síntese da enzima (MORILLA et al., 1973) e/ou com um aumento na sua taxa de degradação enzimática (BARDZIK et al., 1971). Entretanto, SHANER e BOYER (1976a, 1976b) mostraram que, em plantas de milho, a atividade da enzima é regulada pelo fluxo de nitrato das raízes para as folhas.

Considerando os efeitos da taxa de transpiração na redução do nitrato (Figura 9B), e os resultados que mostram ser a redutase de nitrato induzida pelo substrato (Figuras 4A e 4 B) e ainda as evidências de que as folhas de cana-de-açúcar são desprovidas de um reservatório de nitrato prontamente disponível, pode-se sugerir que o fluxo de nitrato para as folhas, via corrente transpiratória, provavelmente exerce um papel regulatório importante no controle do nível de atividade da redutase de nitrato em lâminas foliares de plantas intactas de cana, conforme também foi verificado por SHANER e BOYER (1976a, 1976b), em plantas de milho.

Apesar da importância da taxa transpiratória no processo de redução de nitrato, deve ser ressaltado que a resistência difusiva estomática desempenha um papel importante na regulação do fluxo da água no sistema solo-planta-atmosfera devido à sua sensibilidade às variações na disponibilidade de água no solo (MEGURO e MAGALHÃES, 1983; SANTOS FILHO, 1985) e também a outros fatores ambientais.

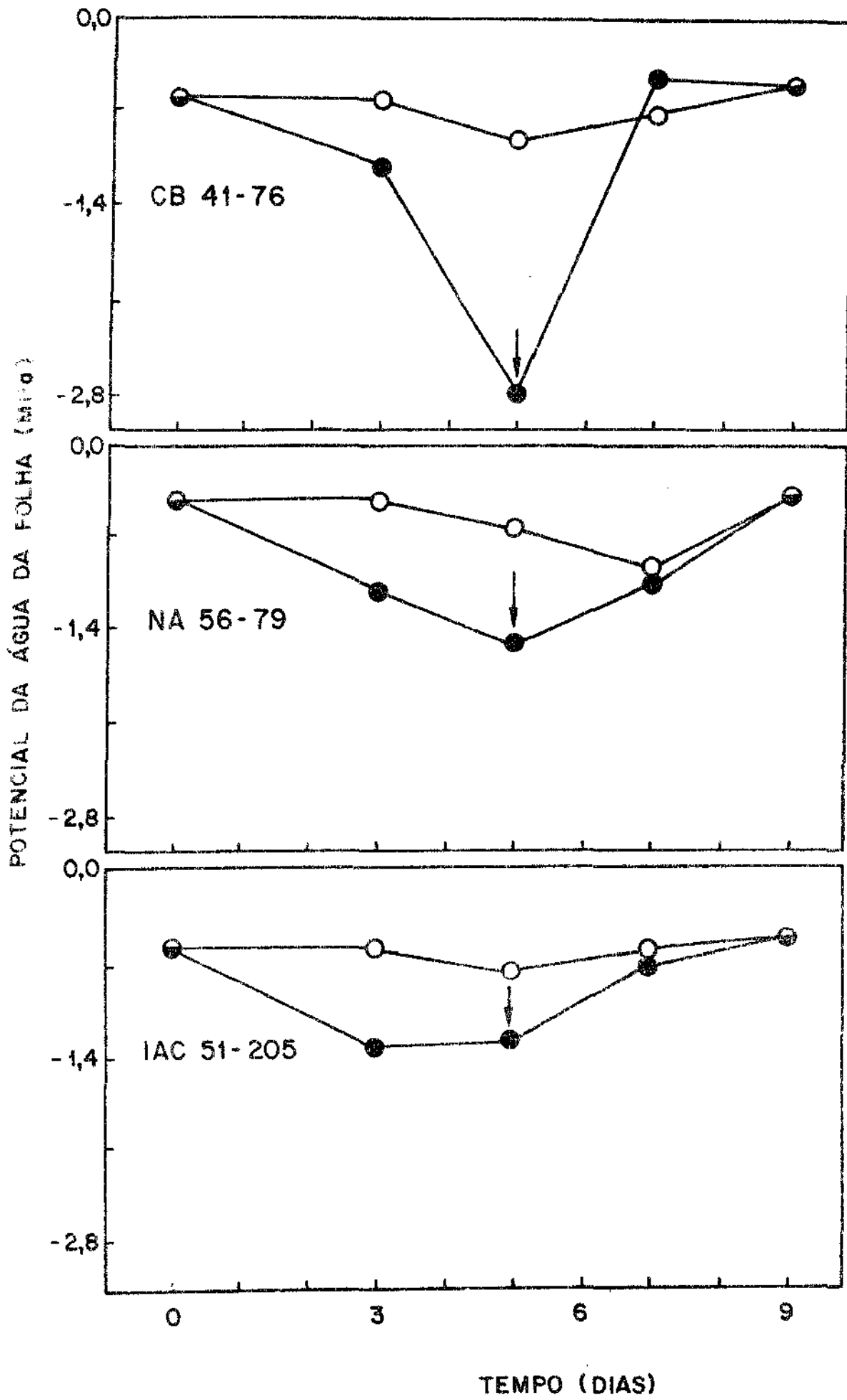
O grau de sensibilidade do processo de redução de ni

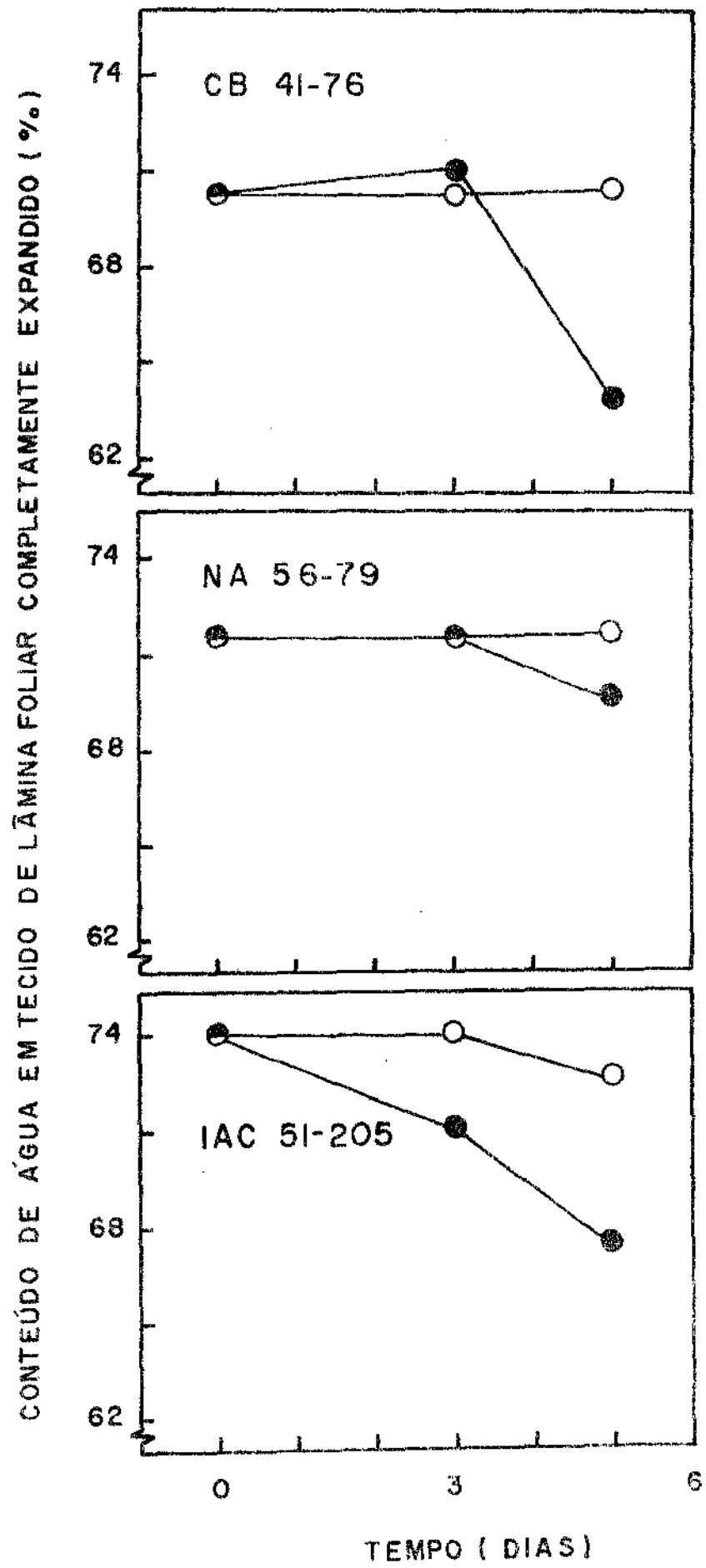
trato a baixos potenciais da água na folha verificado neste trabalho, e em outros envolvendo a própria cana-de-açúcar (VIQUEIRA et al., 1983) e espécies diferentes (BARDZIK et al., 1971; MORILLA et al., 1973; SHANER e BOYER, 1976a, 1976b; MEGURO e MACALHÃES, 1983), sugere que a atividade da redutase de nitrato pode ser utilizada como um critério capaz de avaliar o efeito do estresse hídrico no comportamento fisiológico de genótipos de cana-de-açúcar.

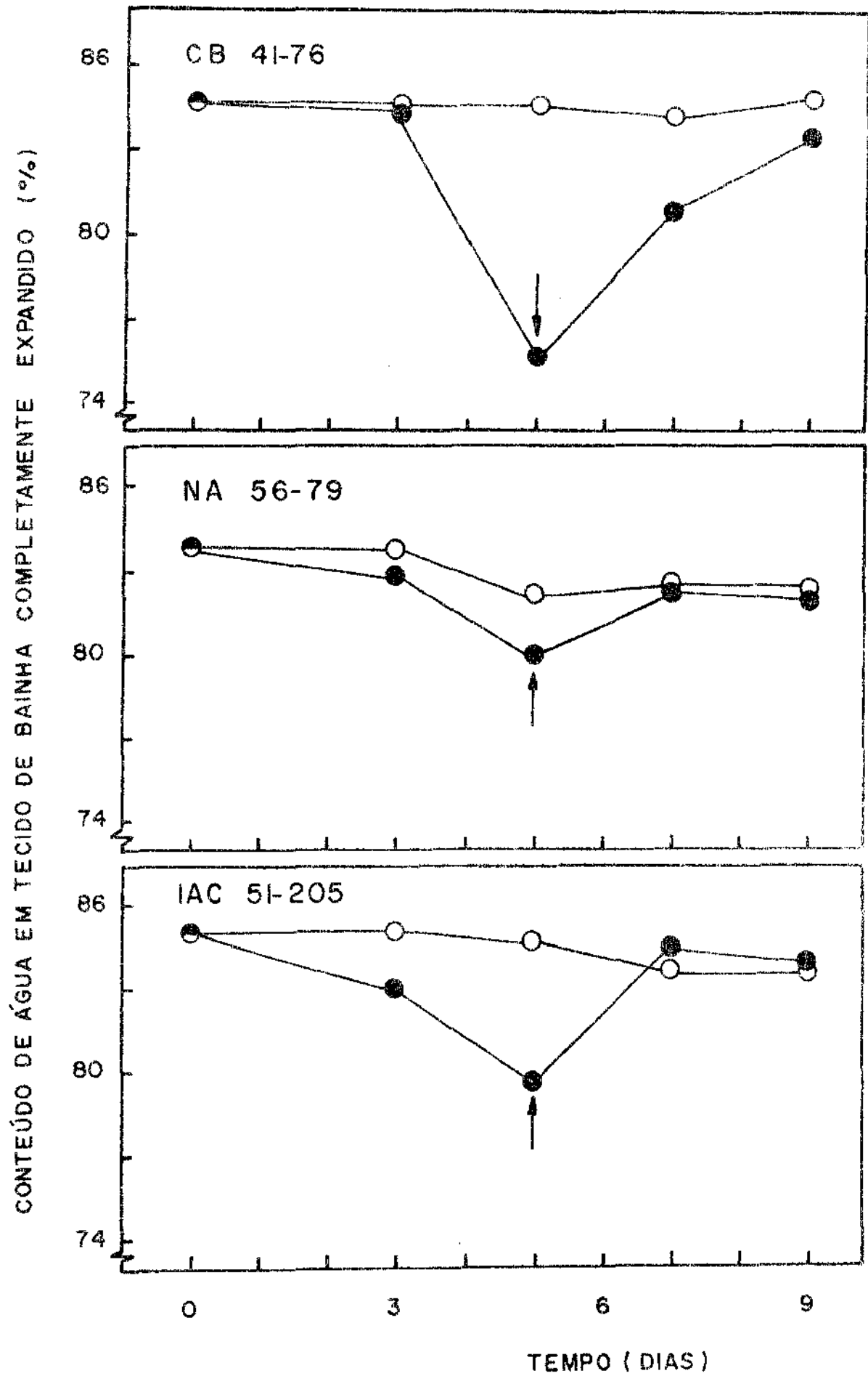
Tem sido verificado em cana-de-açúcar (ROSARIO e SOOKSATHAN, 1977) e *Lolium perene* (BARTA, 1975) que o acúmulo de açúcares nas folhas parece estar associado à baixa atividade da redutase de nitrato.

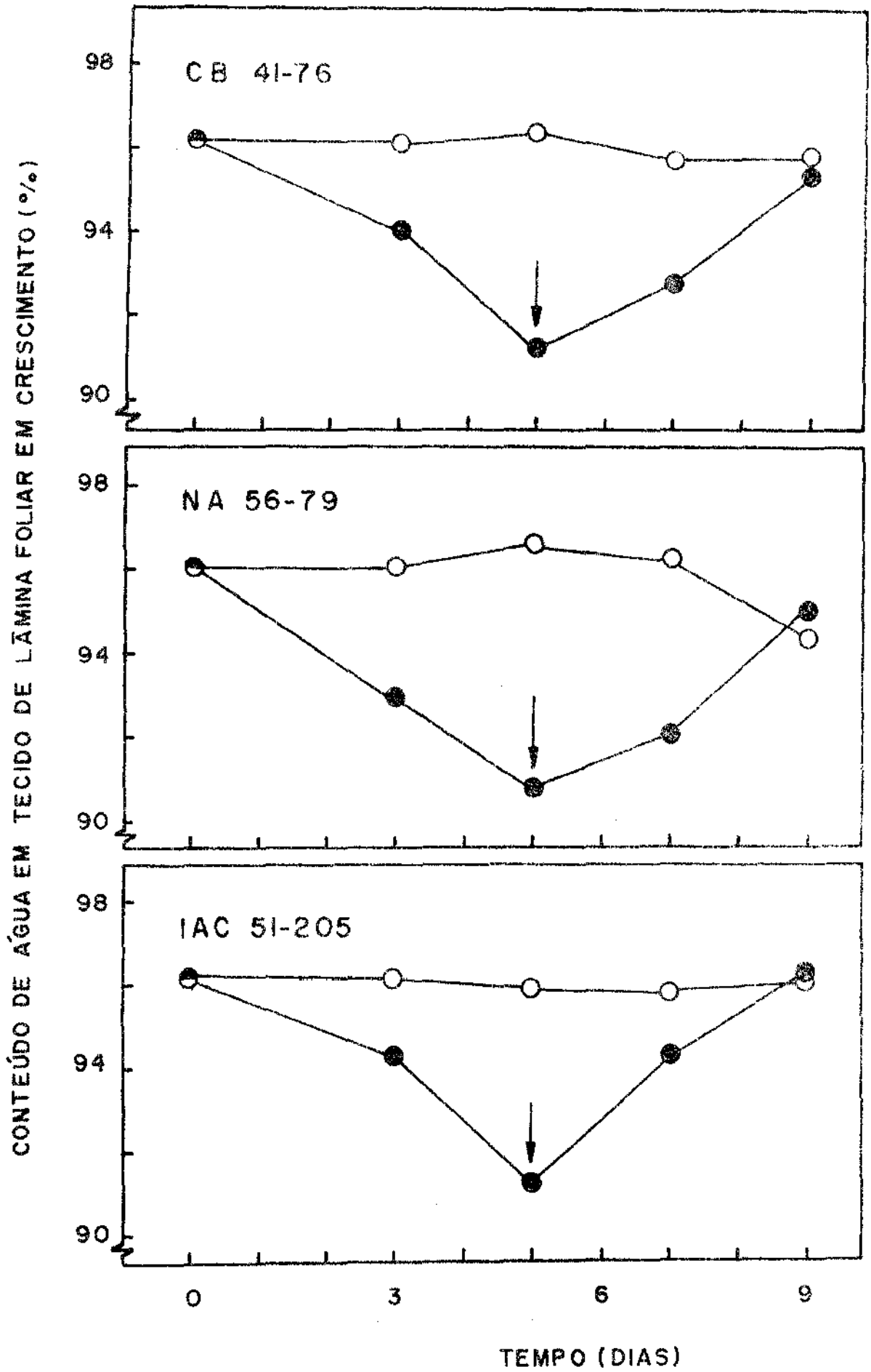
2.2. Alterações no potencial hídrico da folha, conteúdo de água em tecidos em crescimento e completamente expandidos e no crescimento em plantas submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação durante a fase de intenso crescimento vegetativo.

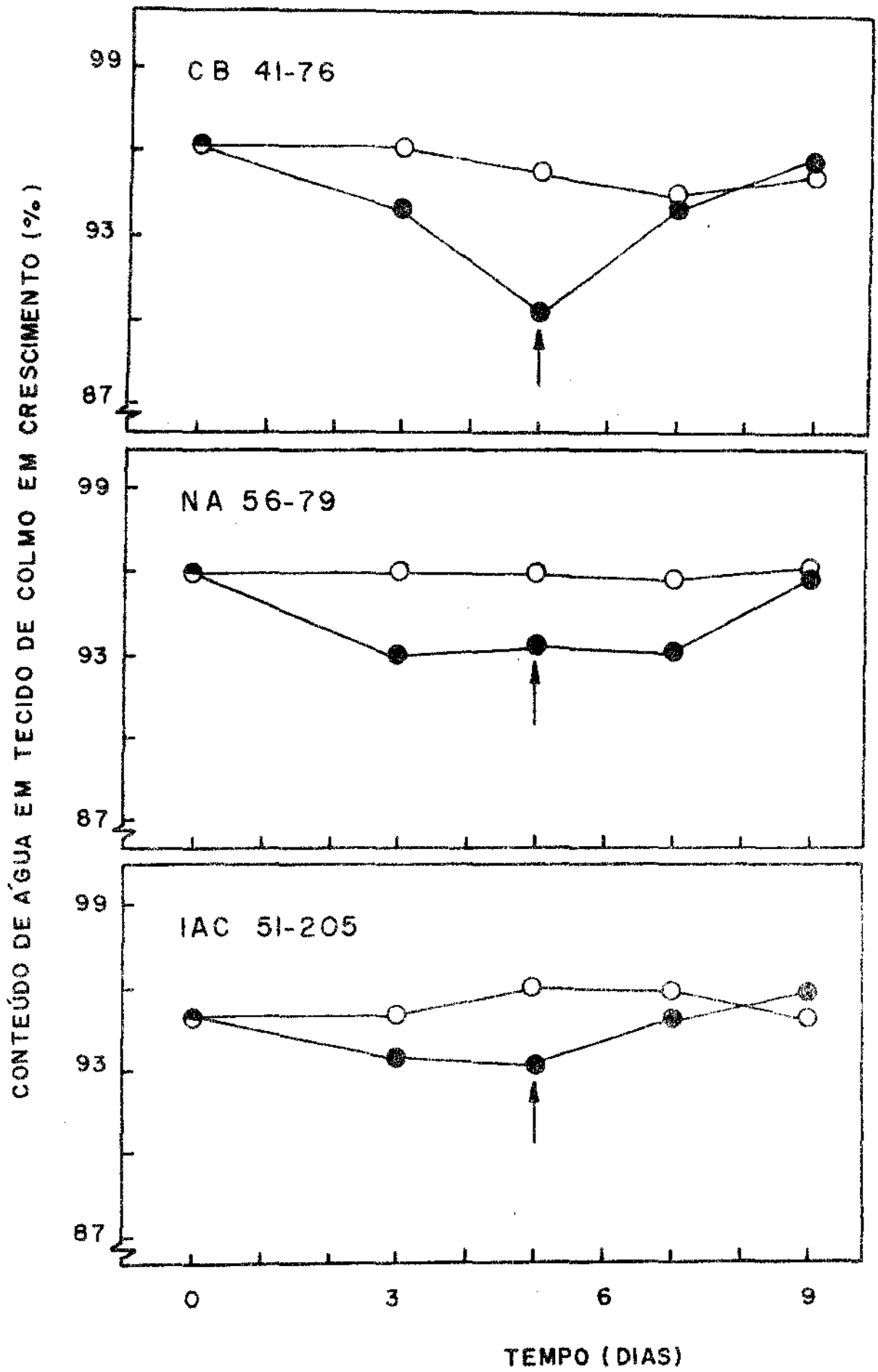
Com a supressão da irrigação do solo, observou-se, em todas as variedades estudadas, um decréscimo no potencial da água da folha (Figura 10) e nos conteúdos de água em tecidos completamente expandidos de lâmina foliar (Figura 11) e bainha (Figura 12) e em tecidos em expansão de lâmina foliar (Figura 13) e colmo (Figura 14). Estas alterações verificadas no estado hídrico das plantas durante o período de indução do déficit hídrico foram acompanhadas por uma acentuada redução na taxa de crescimento relativo foliar (Figura 15). O crescimen

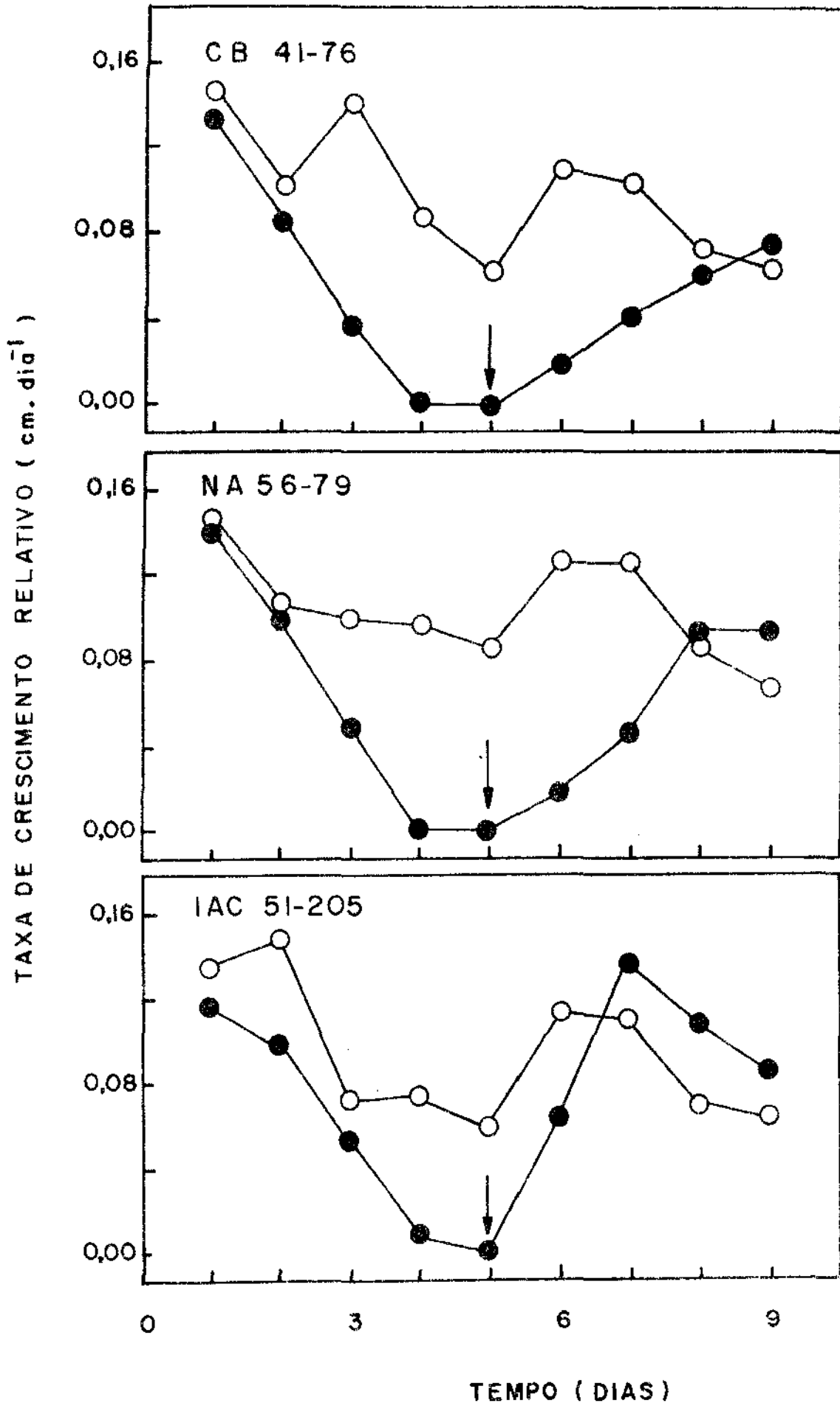












to foi completamente paralizado a partir do quarto dia após a suspensão da irrigação em todas as variedades. Os potenciais da água na folha, neste quarto dia do período experimental, foram de aproximadamente -1,4, -1,2 e -1,1 MPa, respectivamente, para as variedades CB 41-76, NA 56-79 e IAC 51-205.

Depois de 5 dias sem irrigação, as plantas foram reirrigadas e os valores do potencial hídrico da folha indicaram completa recuperação do fluxo de água para os tecidos 48 horas após o fornecimento de água para as plantas nas três variedades (Figura 10). Com exceção da variedade CB 41-76, que não recuperou completamente o conteúdo de água nos tecidos de bainha completamente expandidos, pelo menos até 96 horas após a normalização da irrigação, as demais variedades apresentaram os mesmos padrões de recuperação do potencial hídrico da folha (Figura 12). Entretanto, a recuperação total do conteúdo de água nos tecidos em expansão do colmo (Figura 14), e especialmente da lâmina foliar (Figura 13), foi atingida somente depois de 96 horas do início do período de re-irrigação, para todas as variedades menos para a CB 41-76, que recuperou o conteúdo de água do colmo após 48 horas. Na variedade IAC 51-205 a recuperação total da taxa de crescimento relativo foliar (Figura 15) deu-se nas primeiras 48 horas, enquanto que nas variedades NA 56-79 e CB 41-76, que apresentaram perfis de recuperação muito semelhantes, esta ocorreu depois de 72 horas de reiniciada a irrigação.

Analisando-se as alterações no potencial hídrico da folha (Figura 10) e aquelas nos conteúdos de água nos diferentes tecidos estudados (Figuras 11, 12, 13 e 14), observa-se que a utilização do potencial hídrico da folha isoladamen-

te, com o objetivo de expressar o estado hídrico em outros tecidos que não tiveram o potencial hídrico medido, especialmente aqueles situados no cartucho foliar, poderá não explicar com fidelidade a maioria das alterações fisio-metabólicas ocorridas durante o período de estresse hídrico e de recuperação. Estas considerações estão alicerçadas também nos resultados de MICHELENA e BOYER, (1982) e de WESTGATE e BOYER (1984), que mostraram a ocorrência de menores potenciais hídricos nos tecidos em crescimento que nos expandidos. Em adição, ACEVEDO et al., (1979) demonstraram que a correlação entre o potencial hídrico e o conteúdo relativo de água é instável, e pode variar a cada hora. Estes autores relatam, também, que as medições do potencial hídrico, isoladamente, não fornecem informações suficientes sobre o impacto do estresse hídrico nos processos fisiológicos mediados pelo conteúdo de água do tecido ou turgescência celular.

A redução na taxa de crescimento relativo foliar durante o período de estresse hídrico (Figura 15) pode ser atribuída, provável e primariamente, a uma queda no potencial de turgescência dos tecidos do meristema intercalar da folha, decorrente da diminuição no conteúdo d'água destes tecidos (Figura 13). Apesar da fotossíntese ser reduzida pelo estresse hídrico devido ao aumento na resistência estomática (NAIDOO et al., 1983; SANTOS FILHO, 1985), causando um decréscimo no fluxo de CO_2 , e/ou em consequência da redução na atividade das reações fotoquímicas e/ou bioquímicas (KRAMER, 1983), tem sido demonstrado que o alongamento celular é frequentemente reduzido, ou mesmo totalmente inibido antes que a fotossíntese seja significativamente afetada (BOYER, 1970b; HSIAO, 1973).

Geralmente considera-se que as taxas de alongamento foliar são determinadas pelas propriedades da parede e pela turgescência celular. WESTGATE e BOYER (1984) relataram que o potencial hídrico nos tecidos em expansão parece ser induzido e mantido pelos processos de crescimento, e que um gradiente de potencial hídrico nestes tecidos é requerido para manter o fluxo de água para as células que estão se expandindo. Estes autores mostram, também, que o potencial de turgescência nos tecidos em expansão é menor que naqueles maduros, e que este menor potencial de turgescência é provavelmente consequência do relaxamento da parede celular durante o crescimento. O decréscimo no potencial hídrico nestas regiões, necessário para a manutenção do fluxo de água e conseqüentemente da turgescência e do alongamento celular é atribuído à diminuição no potencial osmótico destes tecidos (ACEVEDO et al., 1979; MICHELENA e BOYER, 1982; WESTGATE e BOYER, 1984) pela acumulação de solutos osmoticamente ativos (ACEVEDO et al., 1979; MUNNS et al., 1979). Dentre estes solutos parece que o potássio, aminoácidos livres e especialmente os açúcares solúveis representam a principal porção (MUNNS et al., 1979). A importância da acumulação de solutos (ajustamento osmótico) nos tecidos em crescimento e completamente expandidos de plantas submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação, bem como as prováveis relações existentes entre a atividade das invertases com a translocação e acumulação de açúcares, e também com o crescimento foliar, serão discutidos posteriormente.

O padrão de recuperação do crescimento foliar (Figura 15) apresentou maior semelhança com a curva da recuperação do conteúdo de água em tecido de lâmina foliar em crescimento (Figura 13) do que o da recuperação do potencial hídrico foliar (Figura 10). Isto indica que a retomada do crescimento ocorre através de uma resposta retardada em relação à normalização do fluxo de água na planta, e que o potencial de turgescência desempenha um papel fundamental na expansão celular.

Após alguns dias do início do período de recuperação, a taxa de crescimento relativo foliar em plantas previamente estressadas superou aquela das plantas irrigadas normalmente (Figura 15). SLATYER (1973), apud GARGANTINI (1980), sugeriu que plantas cultivadas sob déficit hídrico são fisiologicamente mais jovens do que plantas sob condições normais de disponibilidade de água. Sendo assim, quando o estresse hídrico é eliminado, a taxa de crescimento dessas plantas pode ser maior que nas plantas não submetidas a déficit hídrico, conforme foi verificado por ROBINSON (1963), em cana-de-açúcar. Segundo ZUR *et al.*, (1981) o módulo de elasticidade de folhas de soja diminui com o decréscimo no estado de hidratação destes tecidos. Daí, parece provável que as maiores taxas de crescimento verificadas nas plantas reidratadas que naquelas irrigadas normalmente, podem ser atribuídas ao afrouxamento na parede celular promovido pelo estresse hídrico.

A maior taxa de crescimento nas plantas estressadas verificada na fase de recuperação, está associada, provavelmente, também com a recuperação na atividade das invertases ácida e neutra nos tecidos de lâmina foliar em expansão (Figura

ras 22 e 23), e com o desenvolvimento de maiores atividades osmóticas nesses sítios de utilização e acumulação de açúcares nas plantas submetidas à deficiência hídrica. As observações visuais mostraram claramente que os tecidos de lâminas foliares completamente expandidos das folhas +1, +2, +3, etc, atingidos pelo estresse hídrico, não recuperaram-se e ficaram necrosados. Nestas folhas apenas a nervura central das partes mediana e basal recuperou seu estado de hidratação normal. Entretanto, em todas as variedades estudadas, os tecidos mais jovens, principalmente aqueles pertencentes ao cartucho foliar, e os tecidos de bainha completamente expandidos e de colmos, recuperaram-se completamente após duas semanas do reinício da irrigação.

Com base nestas observações pode-se concluir que o nível de estresse hídrico imposto não foi suficientemente drástico a ponto de comprometer irreversivelmente os processos fisio-metabólicos essenciais para o crescimento e sobrevivência das plantas.

O envolvimento dos tecidos de folha e de colmo em crescimento por tecidos de bainha e folha expandidos restringe a perda direta de água nos tecidos encartuchados (MUNNS et al., 1979; WESTGATE e BOYER, 1984). Segundo MUNNS et al. (1979), o bloqueio ou ruptura da continuidade vascular entre tecidos encartuchados e expostos ao ambiente após o murchamento e dessecação destes últimos, juntamente com o ajustamento osmótico nos tecidos encartuchados (também verificado por HENSON et al., 1982 e WESTGATE e BOYER, 1984), pode favorecer a conservação d'água nestes tecidos, mantendo o potencial de turgescência positivo, que pode ser um importante fator res-

ponsável pela recuperação e sobrevivência dos tecidos encartu-
chados. Todavia, ainda não existem evidências inequívocas de
que a manutenção de potencial de turgescência positivo seja ne-
cessário para a sobrevivência.

A maior tolerância ao estresse hídrico da varie-
dade IAC 51-205 em comparação com a maior sensibilidade da va-
riedade CB 41-76 e tolerância intermediária da variedade NA
56-79 foi observada visualmente durante o período de indução
do déficit hídrico e pode ser confirmada pelos resultados de
potencial hídrico da folha (Figura 10), conteúdo de água nos
tecidos (Figuras 11, 12, 13 e 14) e taxa de crescimento rela-
tivo foliar (Figura 15). Apesar destes resultados serem con-
cordantes com aqueles obtidos por BRINHOLI (1975) e SANTOS FI-
LHO (1985), nas mesmas variedades estudadas, a tolerância di-
ferencial dessas variedades ao estresse hídrico neste traba-
lho pode ser questionável pelos seguintes aspectos. Primeiro,
a variedade considerada mais tolerante por apresentar maior
potencial d'água na folha, menor queda e recuperação mais rá-
pida na taxa de crescimento foliar, foi aquela que, aparente-
mente, apresentava as plantas com uma menor área foliar to-
tal. A variedade CB 41-76 apresentou uma área foliar apar-
tamente maior que a NA 56-79. Mesmo não sendo feita qualquer
medição de área foliar, sistema radicular e do potencial hí-
drico do solo, pode-se inferir, apenas baseando-se nas obser-
vações visuais de área foliar, que o tamanho da superfície de
transpiração foi pelo menos um dos prováveis responsáveis pe-
las diferenças varietais apresentadas. Um outro aspecto que
merece ser ressaltado é que após alguns dias do início do pe-
ríodo de reirrigação, as observações visuais mostraram

tir qualquer diferença entre as plantas-controle e aquelas previamente estressadas, em todas as variedades.

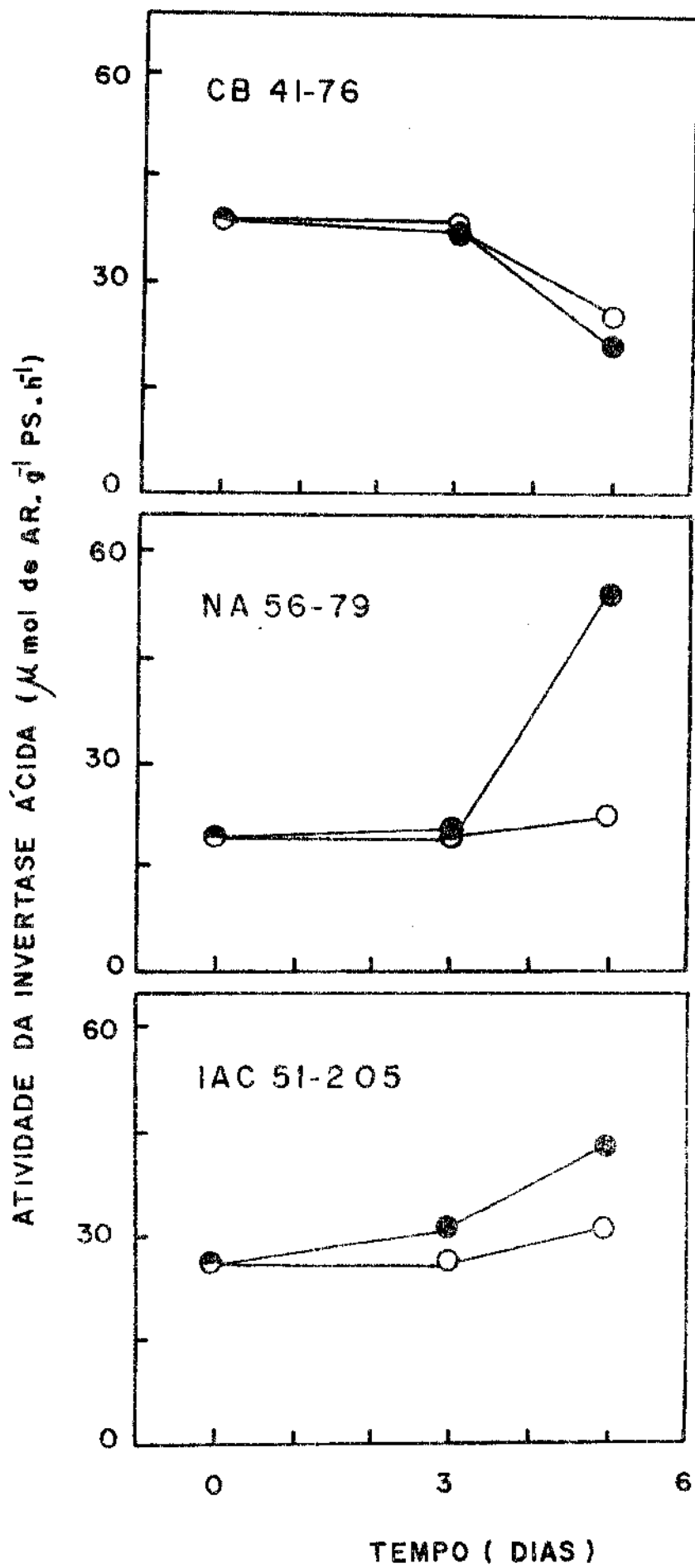
Algumas diferenças metabólicas entre as variedades, durante o período experimental, serão apresentadas e discutidas posteriormente.

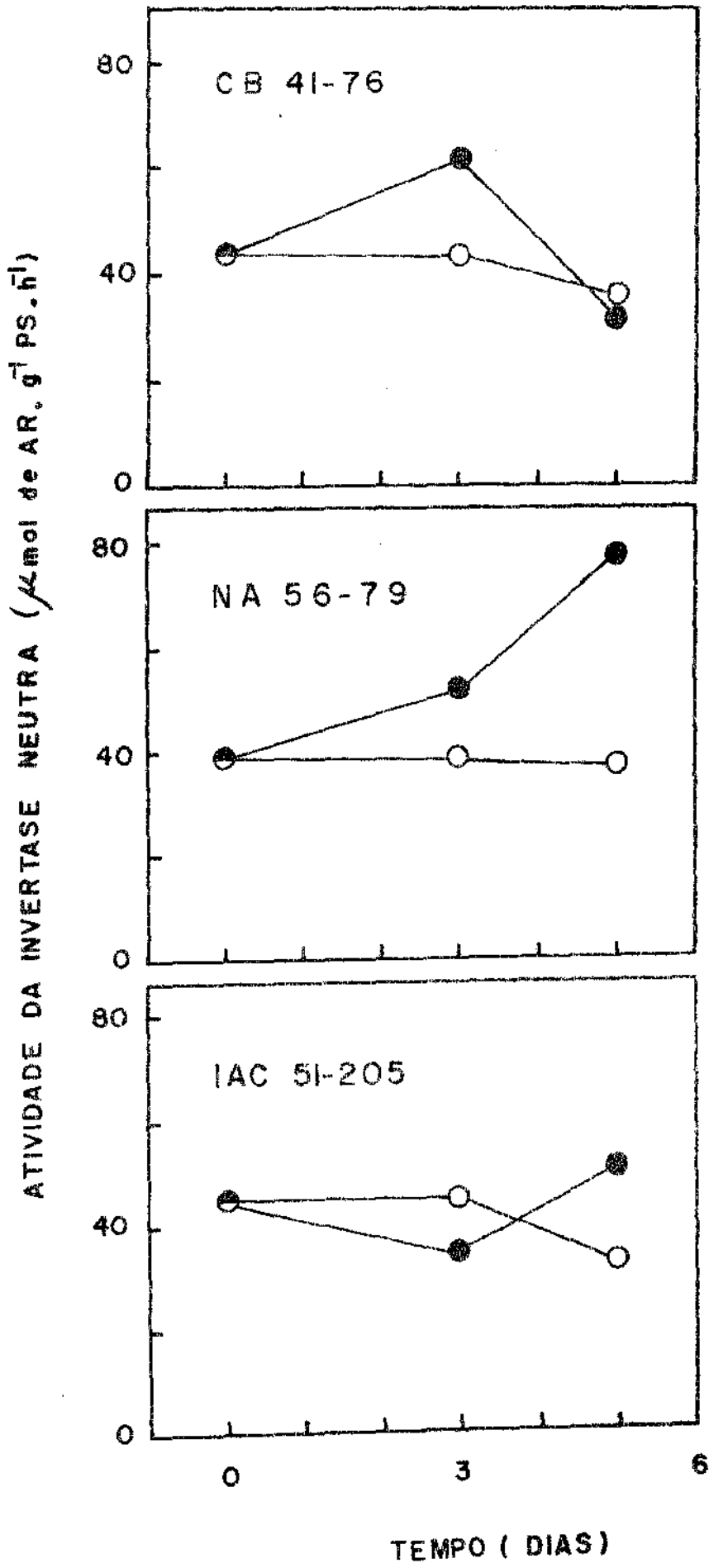
2.3. Alterações nas atividades invertásicas e nas concentrações de carboidratos solúveis e de $N-\alpha NH_2$ em tecidos organogênicamente diferentes, de plantas submetidas a estresse hídrico e posterior recuperação: fase de intenso crescimento vegetativo.

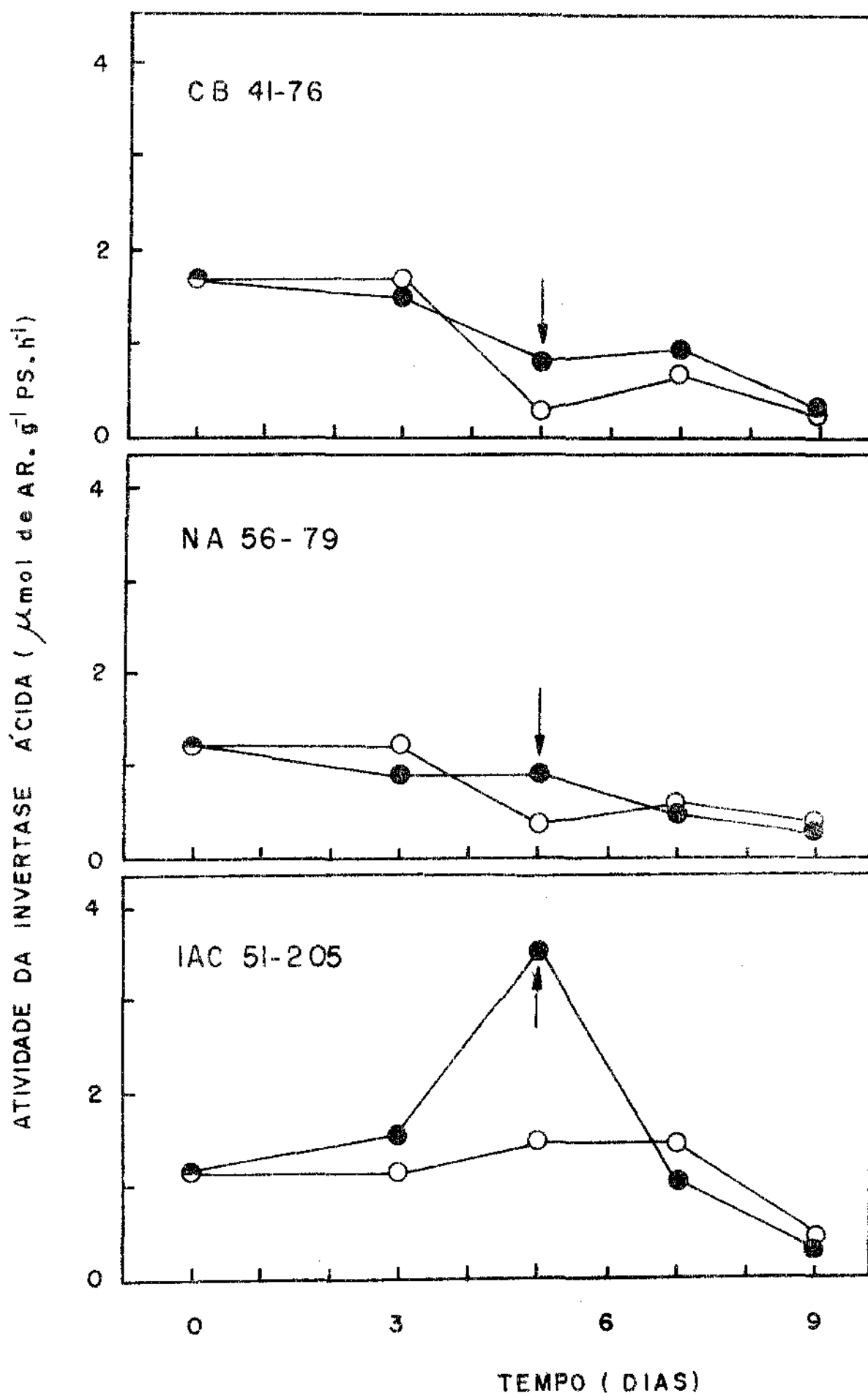
2.3.1. Atividades das invertases ácida e neutra.

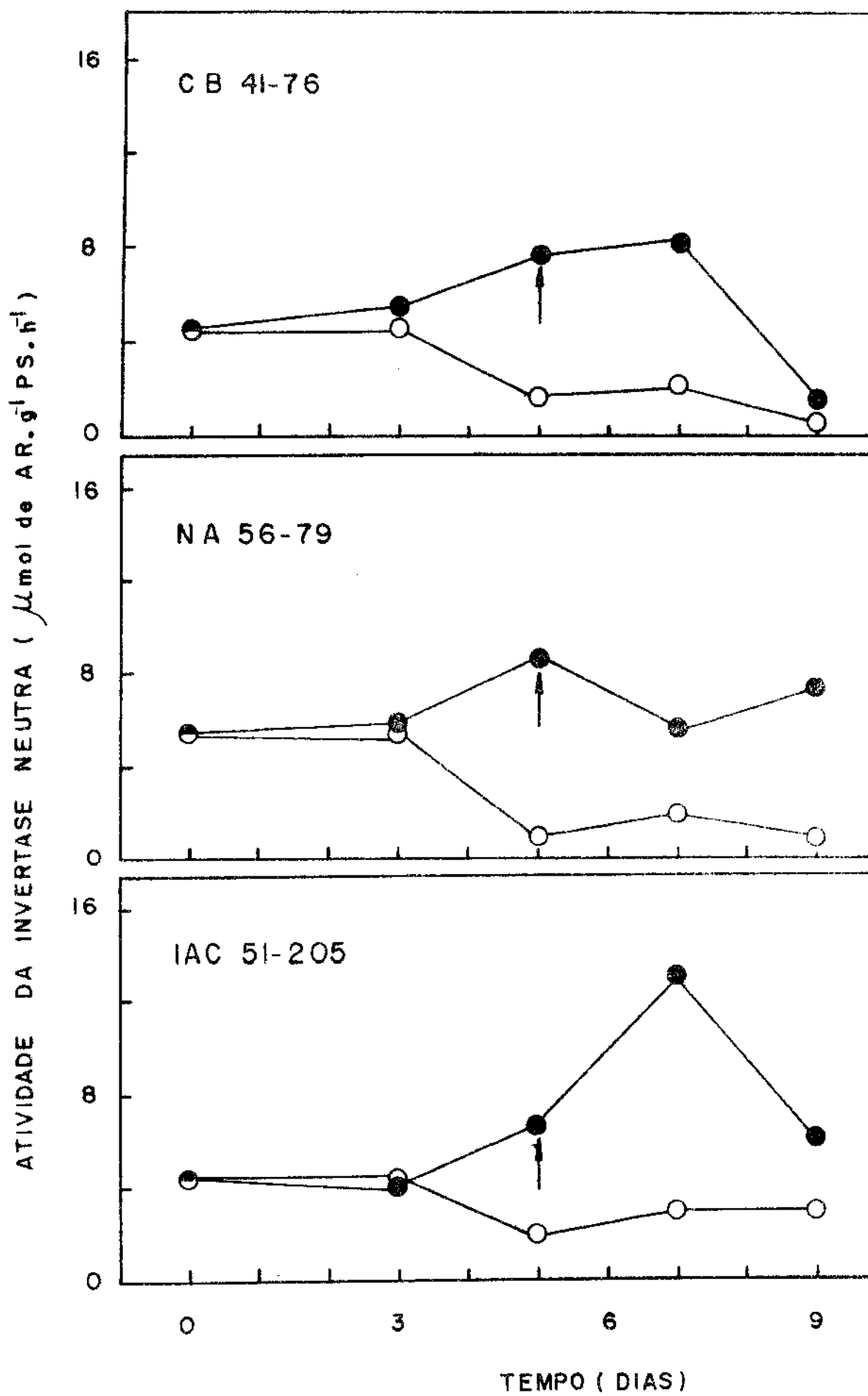
Com a suspensão no fornecimento de água para as plantas observou-se um aumento na atividade das invertases ácida e neutra nos tecidos completamente expandidos de lâmina foliar (Figuras 16 e 17) e de bainha (Figura 18 e 19), nas variedades NA 56-79 e IAC 51-205. Por outro lado, nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos na variedade CB 41-76, evidenciou-se uma ligeira tendência de redução na atividade das isoenzimas ácida (Figura 16) e neutra (Figura 17), no final do período de estresse.

Quanto às atividades invertásicas nos tecidos em expansão observou-se que, com a imposição da deficiência hídrica, a atividade da isoenzima ácida diminuiu, tanto na lâmina foliar (Figura 20) como no colmo (Figura 22). Nas plantas com deficiência hídrica, representantes das variedades CB 41-





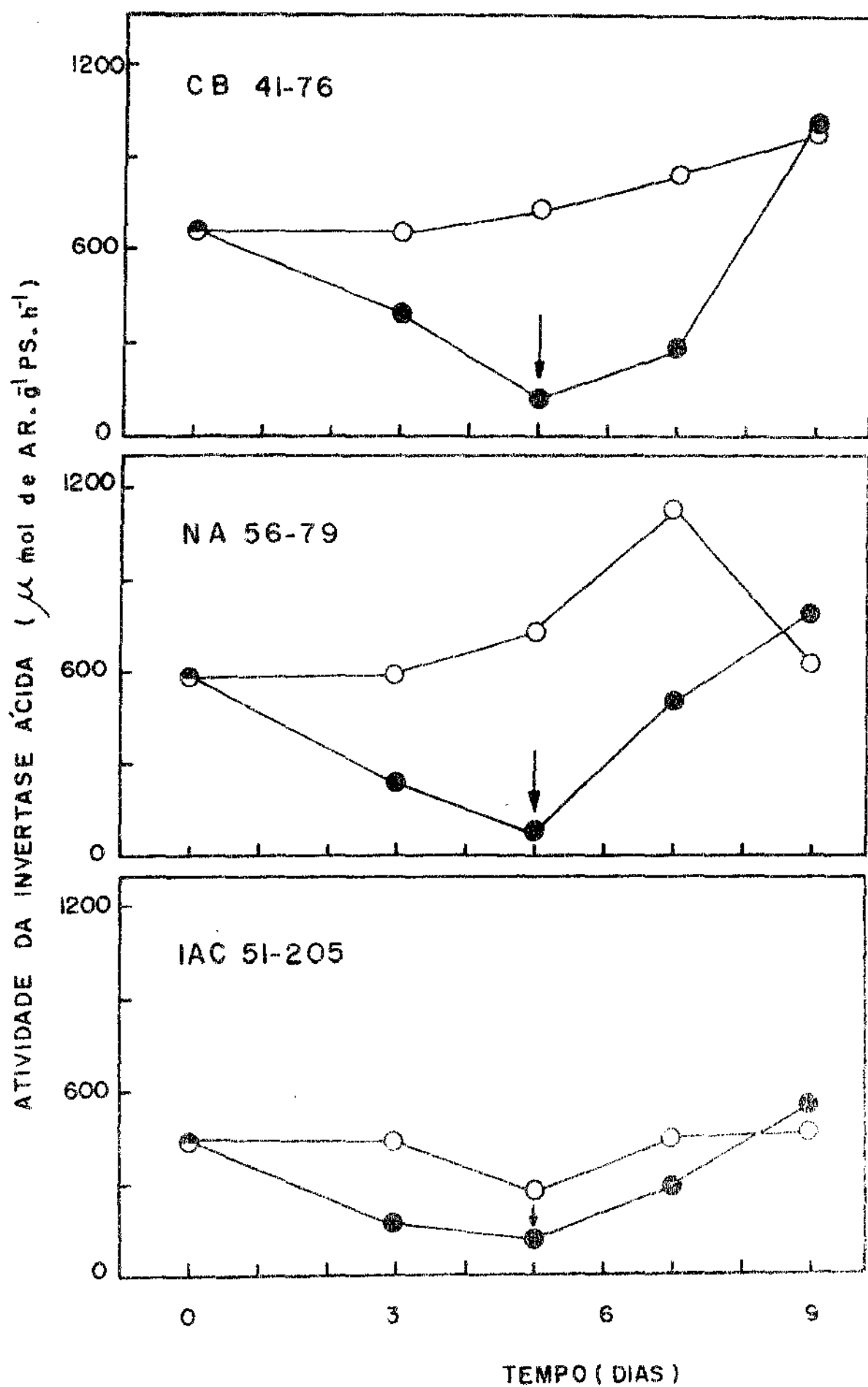


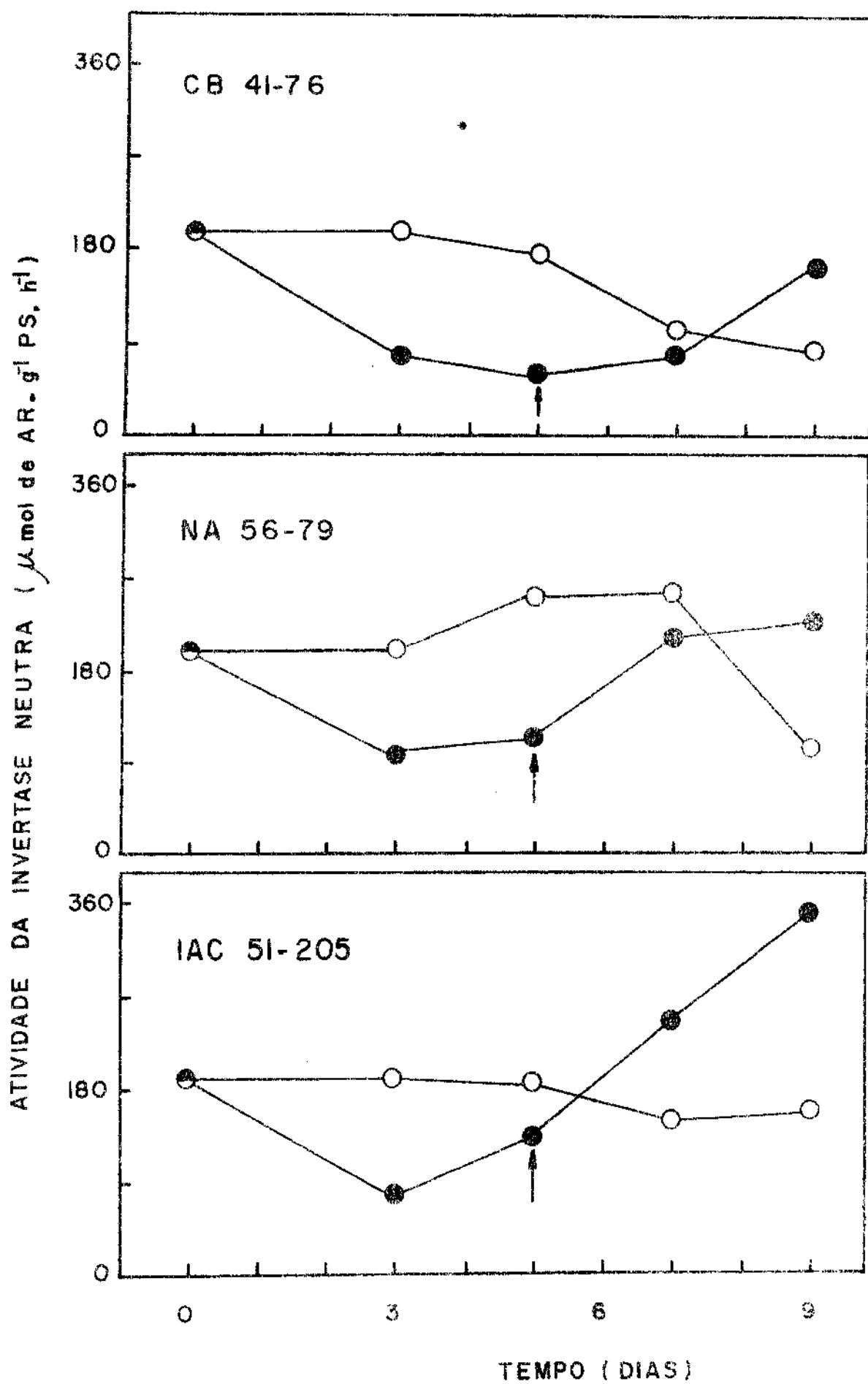


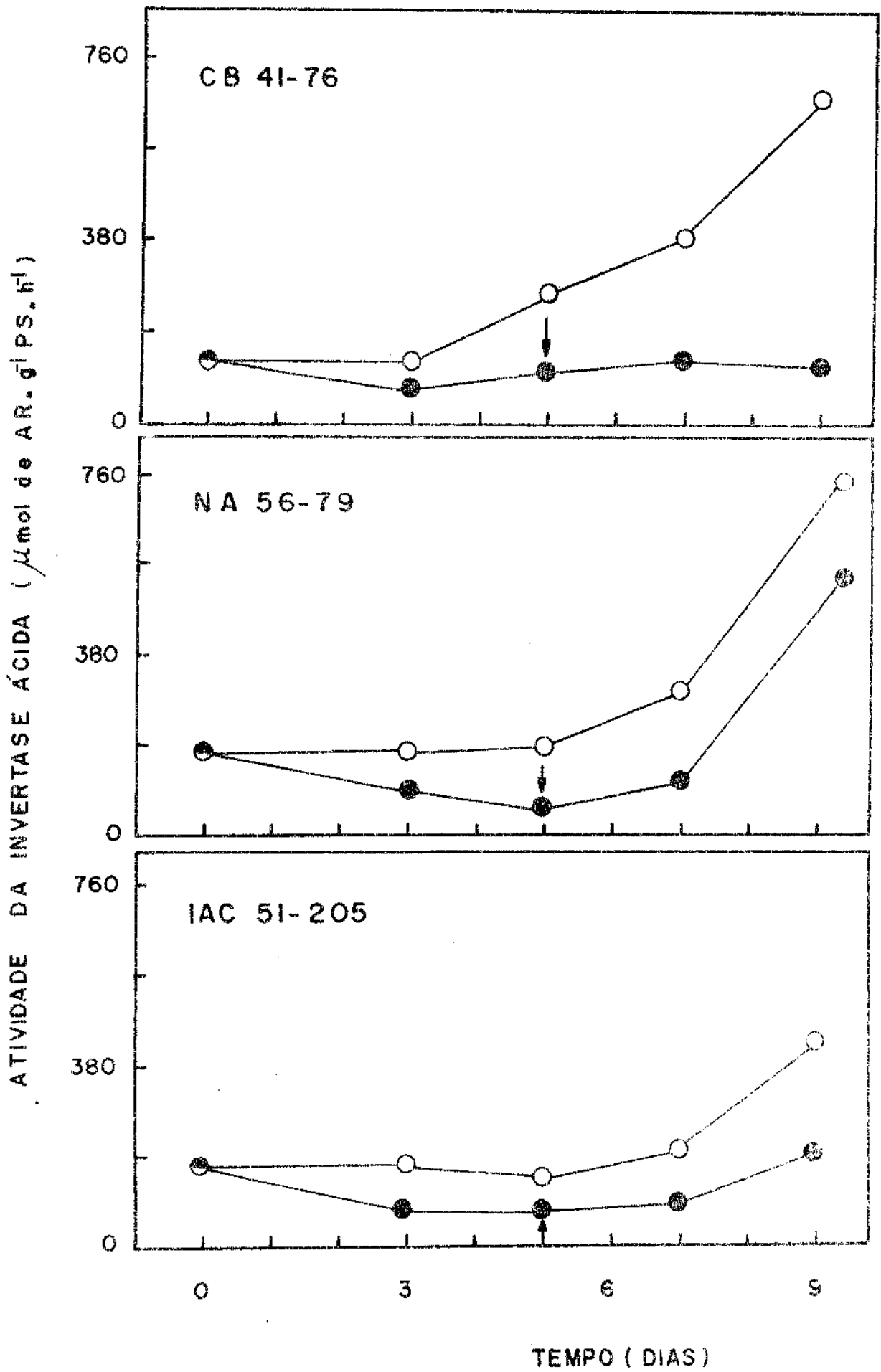
76 e NA 56-79, a atividade da invertase neutra foi reduzida nos tecidos de lâmina foliar (Figura 21) e de colmo (Figura 22). Porém, na variedade IAC 51-205 esta redução ocorreu somente nos tecidos de lâmina foliar em crescimento. O decréscimo na atividade da invertase ácida da lâmina foliar (Figura 20) foi maior que aquele observado no colmo (Figura 22) e na invertase neutra destes mesmos tecidos (Figura 21 e 23). Entretanto, ao final do período de estresse hídrico, a variedade IAC 51-205 foi aquela que manteve, comparativamente aos demais materiais estudados, as maiores atividades invertásicas.

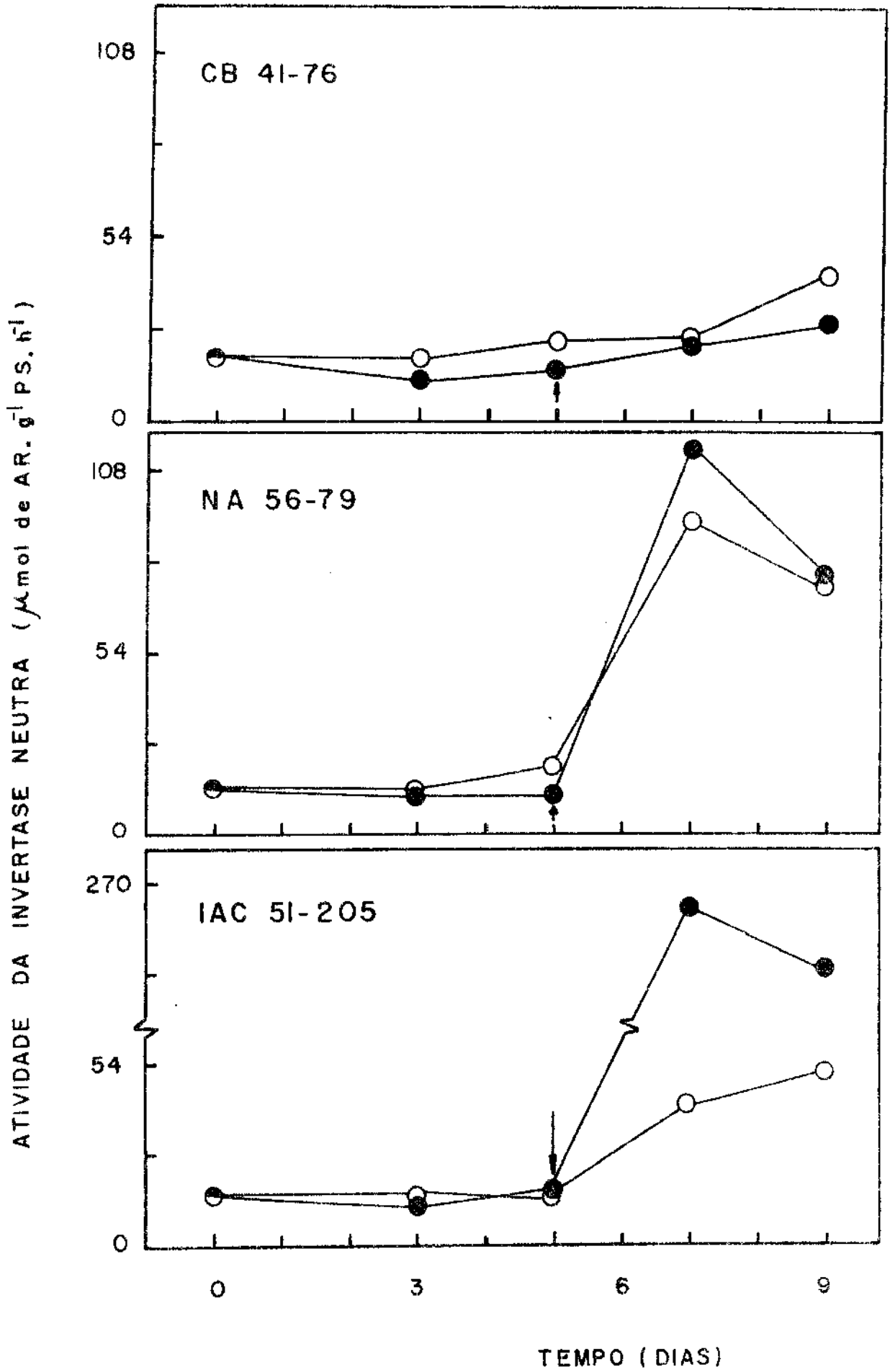
Comparando-se as atividades das invertases solúveis de tecidos completamente expandidos de lâmina foliar (Figuras 16 e 17) e bainha (Figuras 18 e 19), com aquelas determinadas em tecidos em expansão de lâmina foliar (Figuras 20 e 21) e colmo (Figura 22 e 23), observa-se que nestes últimos tecidos a atividade invertásica é muito superior àquela dos tecidos expandidos, especialmente da bainha. Esta maior atividade pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao maior conteúdo de água nos tecidos em expansão (Figuras 13 e 14) comparados aos tecidos completamente expandidos (Figuras 11 e 12). Esta afirmação baseia-se no fato de que as amostragens para as análises bioquímicas foram realizadas utilizando valores de peso fresco, onde a fração solúvel dos tecidos em expansão é maior que a insolúvel.

Como foi verificado anteriormente, os efeitos do estresse hídrico sobre as atividades das invertases ácida e neutra são contrastantes considerando os tecidos em crescimento e completamente expandidos.









É mencionado na literatura que a atividade das invertases aumenta nos tecidos de folhas em senescência natural (POLLOCK e LLOYD, 1977; 1978) e induzida por estresse hídrico (VASSILIEV e VASSILIEV, 1936; VIEIRA DA SILVA, 1970; ADJAHOSSOU, 1983). HATCH e GLASZIOU (1963) relatam que a deficiência hídrica provocou um aumento na atividade da isoenzima neutra nos tecidos de colmo de cana-de-açúcar em fase de acumulação de sacarose. Entretanto, nos tecidos de colmo em crescimento (HATCH e GLASZIOU, 1963) e de folhas de milho e feijão (HAWKER e WALKER, 1978; HAWKER, 1980), a atividade da isoenzima ácida decresceu com a imposição do estresse hídrico.

Os aumentos nas atividades das invertases ácida (vacuolar) e neutra (citoplasmática) observados nos tecidos completamente expandidos, durante o processo de senescência induzido pela deficiência hídrica podem resultar em efeitos benéficos para a manutenção dos processos fisiológicos sob condições de estresse (VIEIRA DA SILVA, 1970; ADJAHOSSOU, 1983). A liberação de glicose e frutose, não só atende à demanda metabólica destes tecidos mas também possibilita uma diminuição no potencial osmótico das células sem a necessidade de alterações substanciais nos gastos energéticos e no consumo de carbono para a biossíntese de novas substâncias osmoticamente ativas. A quebra de uma molécula de sacarose em duas de monossacarídeo promove a duplicação na concentração osmótica das células, atribuída, anteriormente, somente à sacarose (ACFVBERG *et al.*, 1979). Este pode ser um provável mecanismo para o estabelecimento de gradientes de potenciais osmóticos necessários à manutenção da absorção de água pelos tecidos ou, alter

nativamente, inibir sua desidratação evitando que o potencial de turgescência atinja níveis críticos, incompatíveis com a manutenção dos processos fisiológicos associados ao crescimento.

Outras enzimas hidrolíticas, tais como, amilases, fosfatases ácidas, fosforilases, proteases e ribonucleases, também têm suas atividades aumentadas nos tecidos em processo de senescência natural ou induzida pelo estresse hídrico (VIEIRA DA SILVA, 1970; TODD, 1972; VIEIRA DA SILVA, 1976; ADJAHOSSOU, 1983). Conseqüentemente, estas enzimas, através dos produtos de hidrólise, também contribuiriam para a diminuição do potencial osmótico dos tecidos. Indubitavelmente, dentre as enzimas hidrolíticas, as invertases presentes nos tecidos de cana-de-açúcar podem exercer um papel muito importante neste tipo de ajustamento osmótico, constituindo-se em uma importante estratégia de sobrevivência das plantas submetidas a condições de baixa disponibilidade de água no solo. Entretanto, é importante salientar que a importância deste mecanismo de ajustamento osmótico, durante o processo de senescência induzido pelo estresse hídrico, é variável com o órgão da planta e também com a intensidade e tempo de duração do estresse que as plantas são submetidas.

As quedas nas atividades das invertases, especialmente da isoenzima ácida, nos tecidos em expansão de colmo e, particularmente, de lâmina foliar, foram acompanhadas pela diminuição na taxa de crescimento relativo foliar (Figura 15). O decréscimo na taxa de crescimento de plantas de cana-de-açúcar, que normalmente é seguido por uma redução na atividade da invertase ácida (HATCH e GLASZIOU, 1963; GLASZIOU e BULL,

1965), pode não ser consequência apenas da inibição dos processos de biosíntese de constituintes celulares a partir das hexoses produzidas pela hidrólise da sacarose. A redução na taxa de crescimento foliar de plantas estressadas parece ser devido, também, a uma provável queda na capacidade dos tecidos em expansão de absorverem água e, conseqüentemente, de estabelecerem potenciais de turgescência necessários para o alongamento celular (ACEVEDO et al., 1979; MUNNS et al., 1979; KOEHLER et al., 1982), conforme foi discutido anteriormente.

Com o reinício do fornecimento de água para as plantas previamente estressadas observou-se um comportamento muito característico no padrão de recuperação de cada isoenzima nos diferentes tecidos e variedades estudados. Nos tecidos de bainha completamente expandidos, em todas as variedades estudadas, ocorreu uma recuperação total na atividade da invertase ácida nas primeiras 48 horas após a reirrigação (Figura 18), enquanto que a invertase neutra não recuperou a atividade no período de 96 horas após a suspensão do estresse hídrico (Figura 19).

Nos tecidos de lâminas foliares em expansão a recuperação da atividade invertásica ácida ocorreu no período compreendido entre 48 e 96 horas (Figura 20), enquanto o aumento pós-irrigação da atividade da invertase neutra deu-se antes deste período (Figura 21). No final do período de avaliação do processo de recuperação, as atividades das invertases, especialmente da isoenzima neutra, determinada nos tecidos foliares em crescimento, superaram aquelas das plantas irrigadas normalmente. Nestes tecidos a recuperação das atividades invertásicas deu-se mais rapidamente na variedade IAC 51-205.

Nos tecidos de colmo em crescimento de plantas da variedade CB 41-76, as atividades das invertases ácida (Figura 22) e neutra (Figura 23) não apresentaram sinais indicativos de recuperação durante o período experimental. Nas outras variedades ocorreu apenas indício de recuperação na atividade da invertase ácida, mais evidente na variedade NA 56-79. O processo de recuperação na atividade da isoenzima neutra foi alcançado nas primeiras 48 horas após a reirrigação, com valores de atividade superiores àqueles obtidos em condições normais de irrigação, e especialmente mais acentuado na variedade IAC 51-205.

Nos tecidos de lâmina foliar em crescimento, o envolvimento da invertase ácida no processo de expansão celular é reforçado pela correlação observada entre os padrões de recuperação da taxa de crescimento foliar (Figura 15) e da atividade desta isoenzima (Figura 20).

Com base nos resultados experimentais verifica-se que a menor capacidade de recuperação da atividade invertásica ácida nos tecidos em crescimento de colmo (Figura 22), comparados com os de lâminas foliares (Figura 20), está associada com uma recuperação mais lenta no crescimento do colmo, em contraste com a rápida retomada do crescimento foliar das plantas reirrigadas.

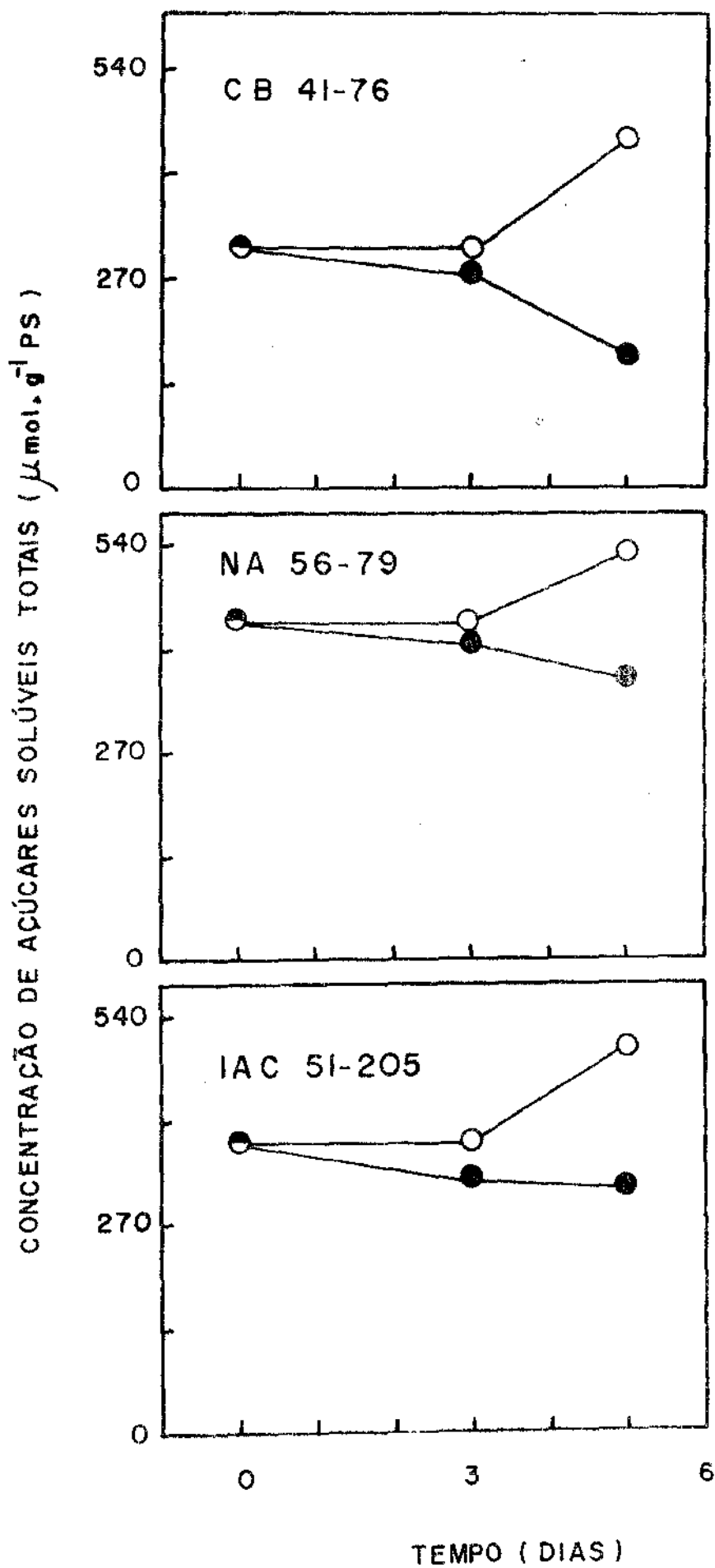
Considerando os tecidos em crescimento, os efeitos da imposição do estresse hídrico foram menos evidentes na variedade IAC 51-205 que nas outras variedades. Com exceção do padrão de recuperação da atividade da isoenzima ácida nos tecidos de colmo, a variedade IAC 51-205 foi aquela que demons

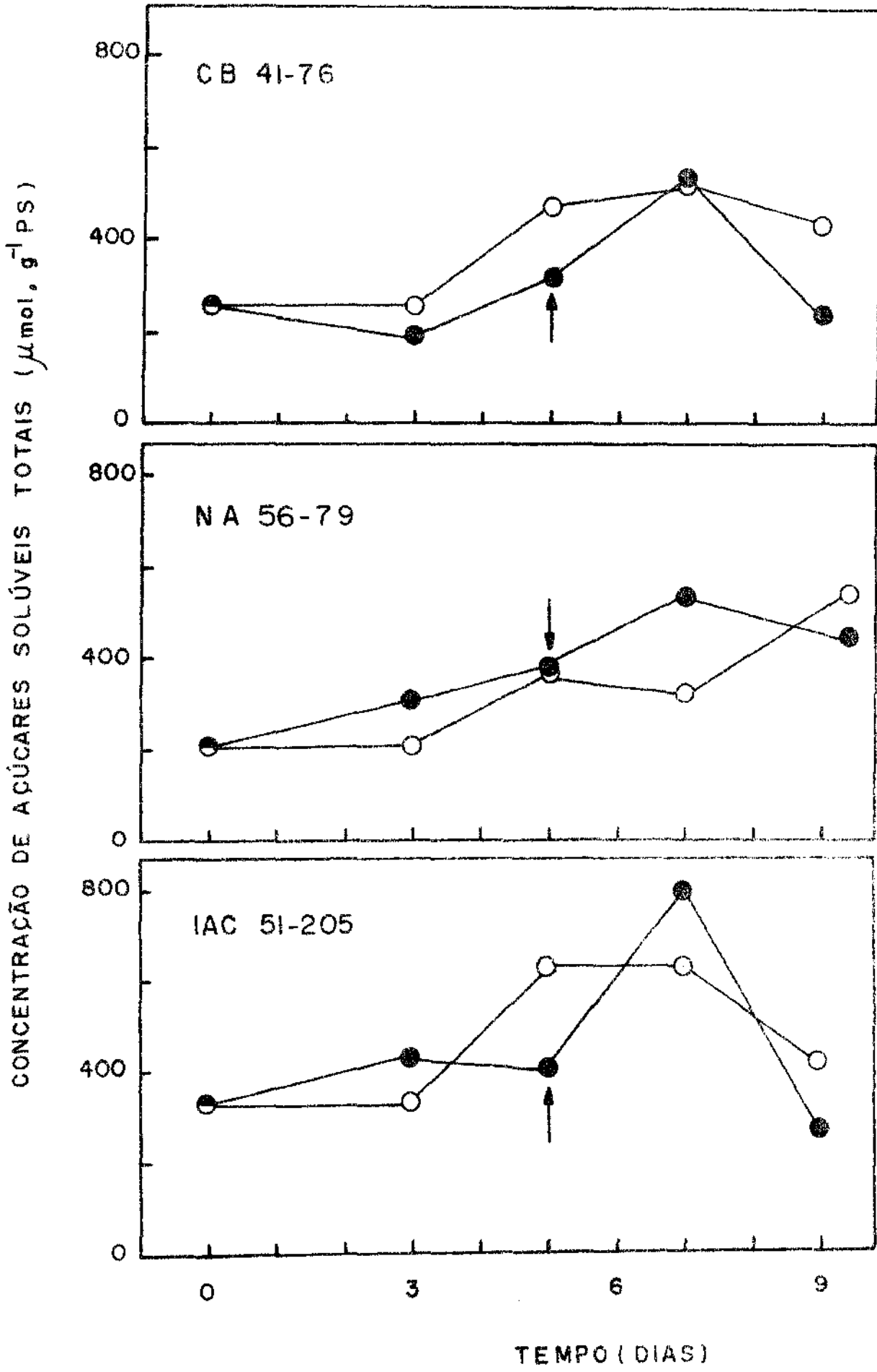
trou melhor desempenho fisiológico durante o processo de recuperação das atividades invertásicas após o restabelecimento do fornecimento de água para as plantas.

Nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos de plantas da variedade CB 41-76, o efeito da deficiência hídrica sobre as atividades invertásicas (Figuras 16 e 17), especialmente no final do período de estresse, parece estar relacionado com as maiores quedas no potencial hídrico (Figura 10) e conteúdo de água (Figura 11). Isto sugere que o nível de desidratação alcançado foi suficientemente severo para promover a desestabilização da molécula enzimática, inativando-a. Estas considerações são fundamentadas, também, por observações visuais, que mostraram um nível de senescência da lâmina foliar mais severo e precoce na variedade CB 41-76 que nas demais variedades.

2.3.2. Concentrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e $N-G NH_2$

Nas três variedades estudadas, a restrição hídrica imposta às plantas resultou numa diminuição da concentração de açúcares solúveis totais nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos (Figura 24). Este mesmo efeito foi observado nos tecidos de bainha completamente expandidos nas variedades CB 41-76 e IAC 51-205, particularmente no final do período de estresse (Figura 25). A variedade NA 56-79 não apresentou qualquer alteração na concentração destes açúcares nos tecidos de bainha no final do estresse hídrico. Entretanto

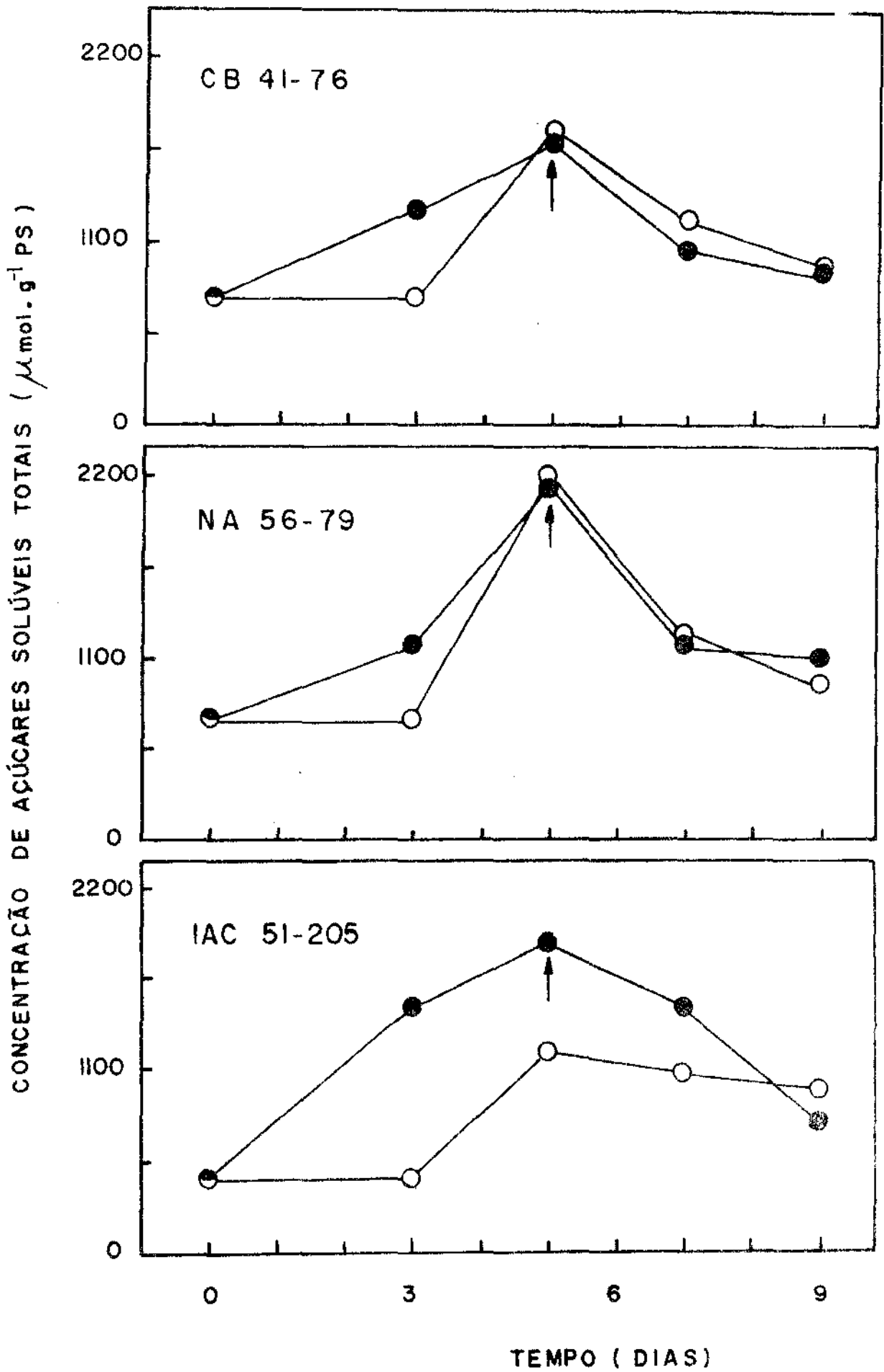


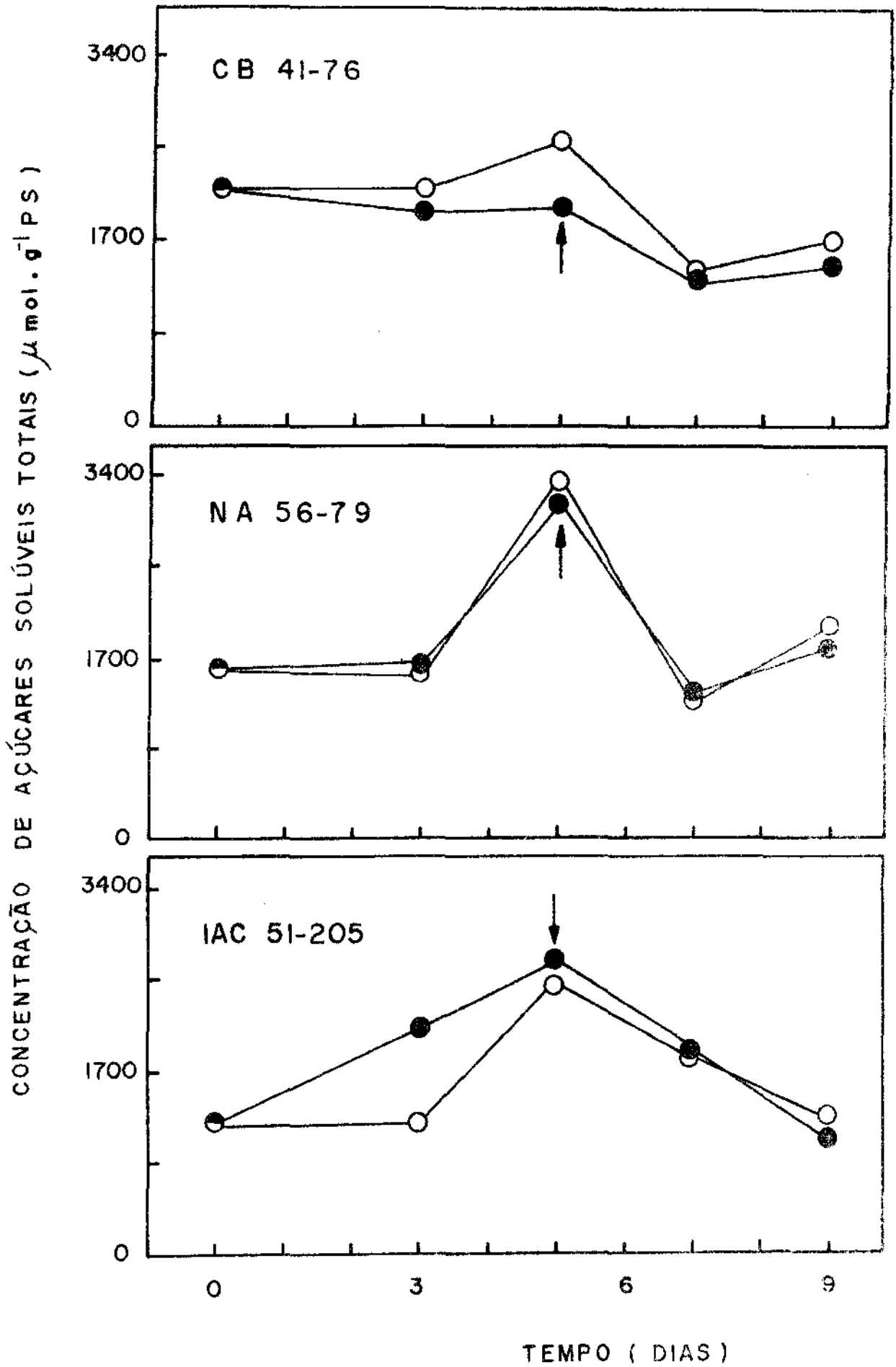


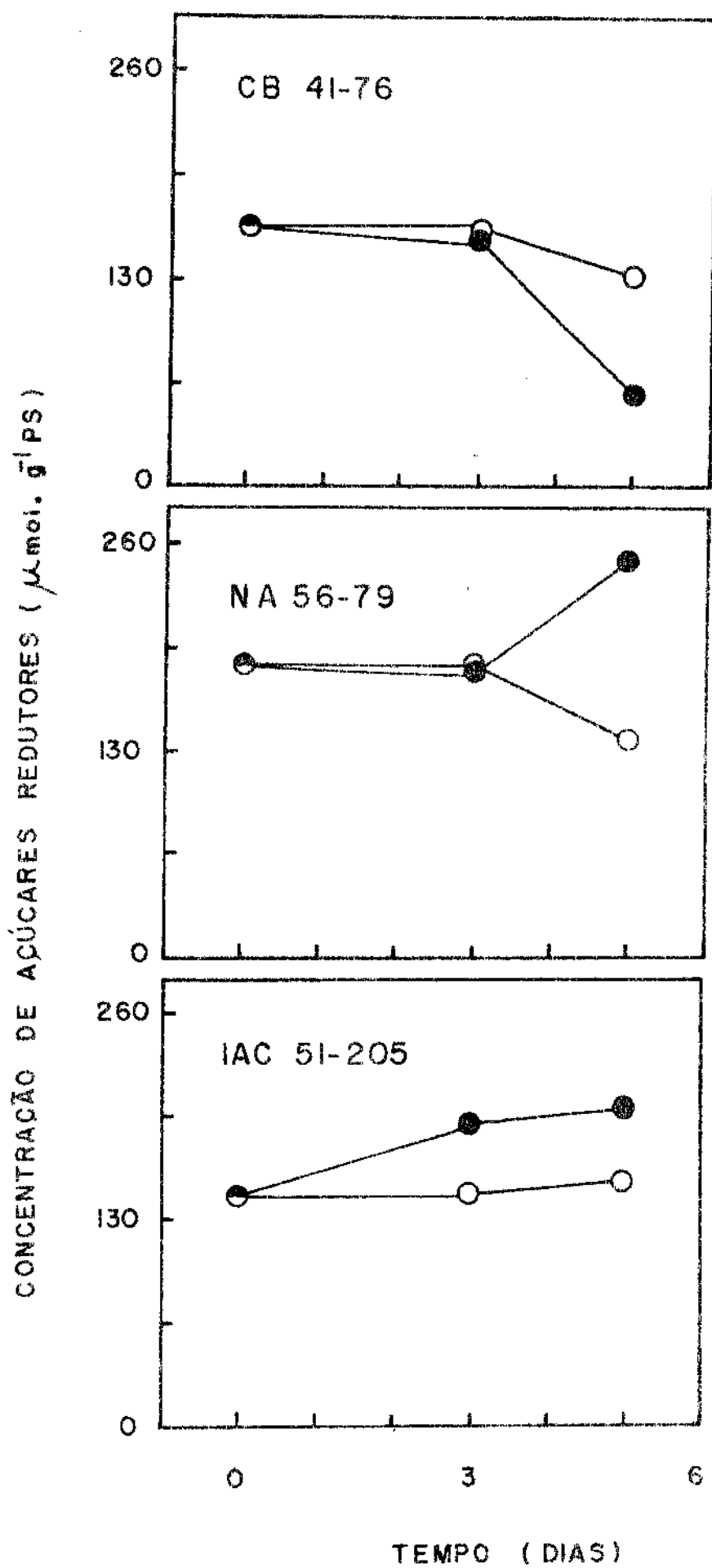
to, nos meados do período do estresse, notou-se uma elevação nas concentrações de açúcares solúveis totais nas variedades NA 56-79 e IAC 51-205 (Figura 25).

Nos tecidos de lâmina foliar em expansão foi detectada uma elevação na concentração dos açúcares solúveis totais, bastante evidente na variedade IAC 51-205, que persistiu ao longo de todo o período de estresse (Figura 26). Contudo, nas variedades CB 41-76 e NA 56-79, as plantas submetidas a estresse hídrico tiveram aumentada a concentração de açúcares solúveis apenas no 3º dia após o início do período de estresse. Quanto aos tecidos de colmo em crescimento, não foram observadas alterações nas concentrações dos açúcares solúveis totais na variedade NA 56-79 durante o período de estresse hídrico (Figura 27). Todavia, enquanto na variedade CB 41-76 ocorreu um decréscimo progressivo na concentração dos açúcares no colmo, observou-se na variedade IAC 51-205, um aumento da concentração no terceiro dia de estresse, com um posterior decréscimo a níveis praticamente normais no final do período de deficiência hídrica.

As concentrações de açúcares redutores nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos aumentaram sob condições de deficiência hídrica nas variedades IAC 51-205 e NA 56-79, sendo que nesta última variedade a elevação ocorreu apenas no final do período de estresse (Figura 28). Entretanto, na variedade CB 41-76 a resposta foi completamente oposta, diminuindo a concentração dos açúcares redutores. Em todas as variedades o teor de açúcares redutores nos tecidos de lâmina completamente expandidos aumentou com a desidratação das plantas.





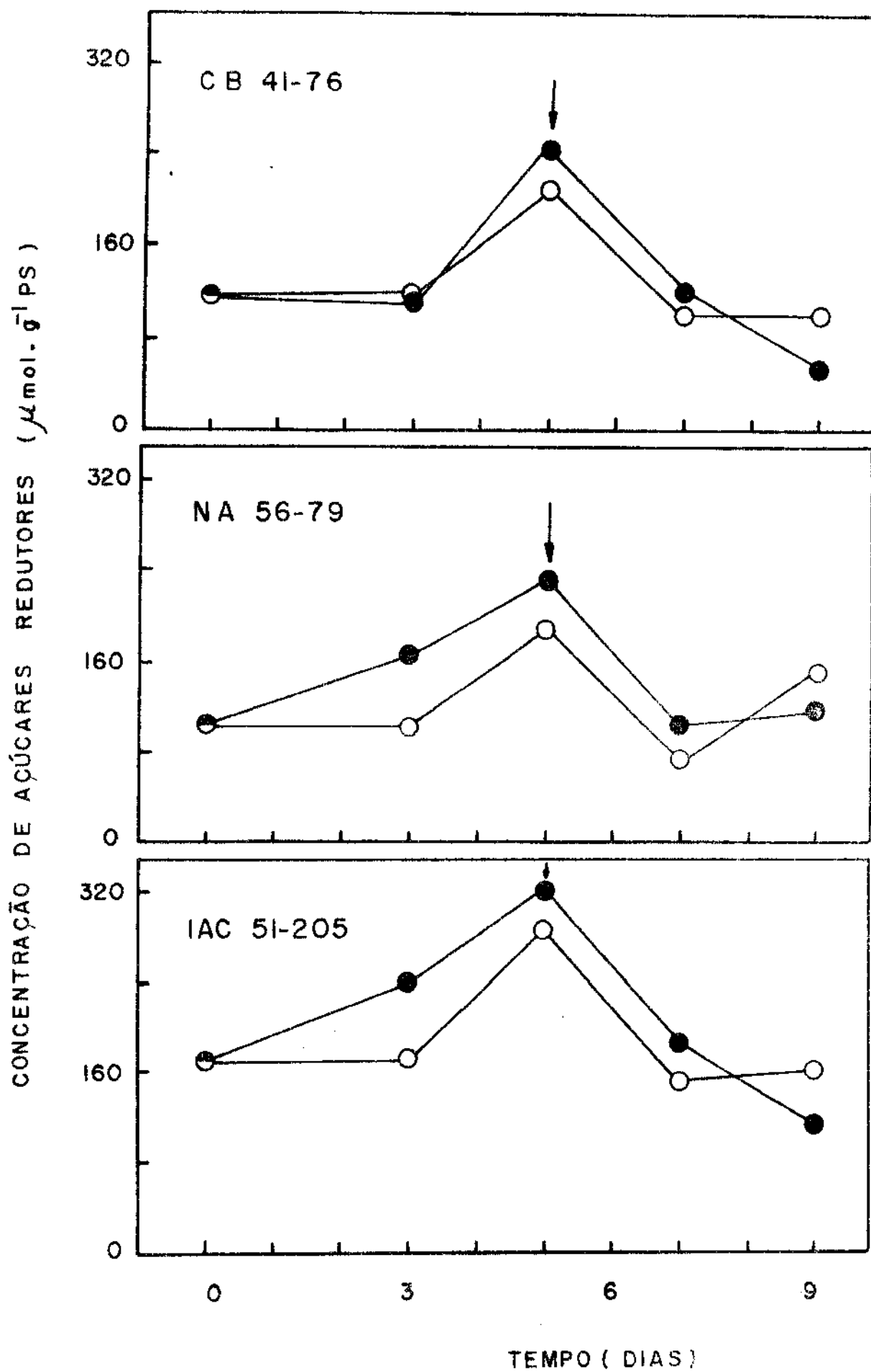


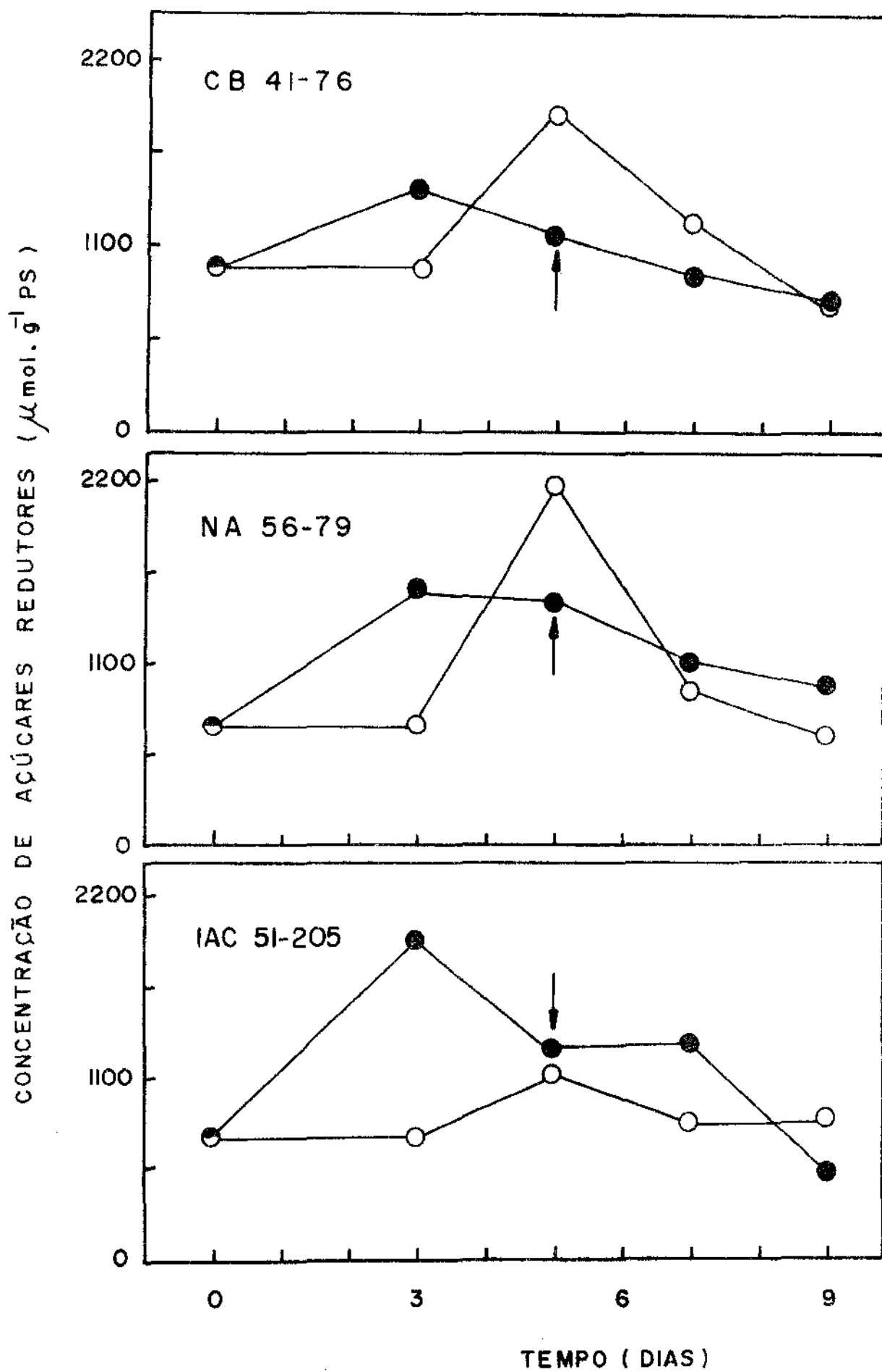
tas (Figura 29).

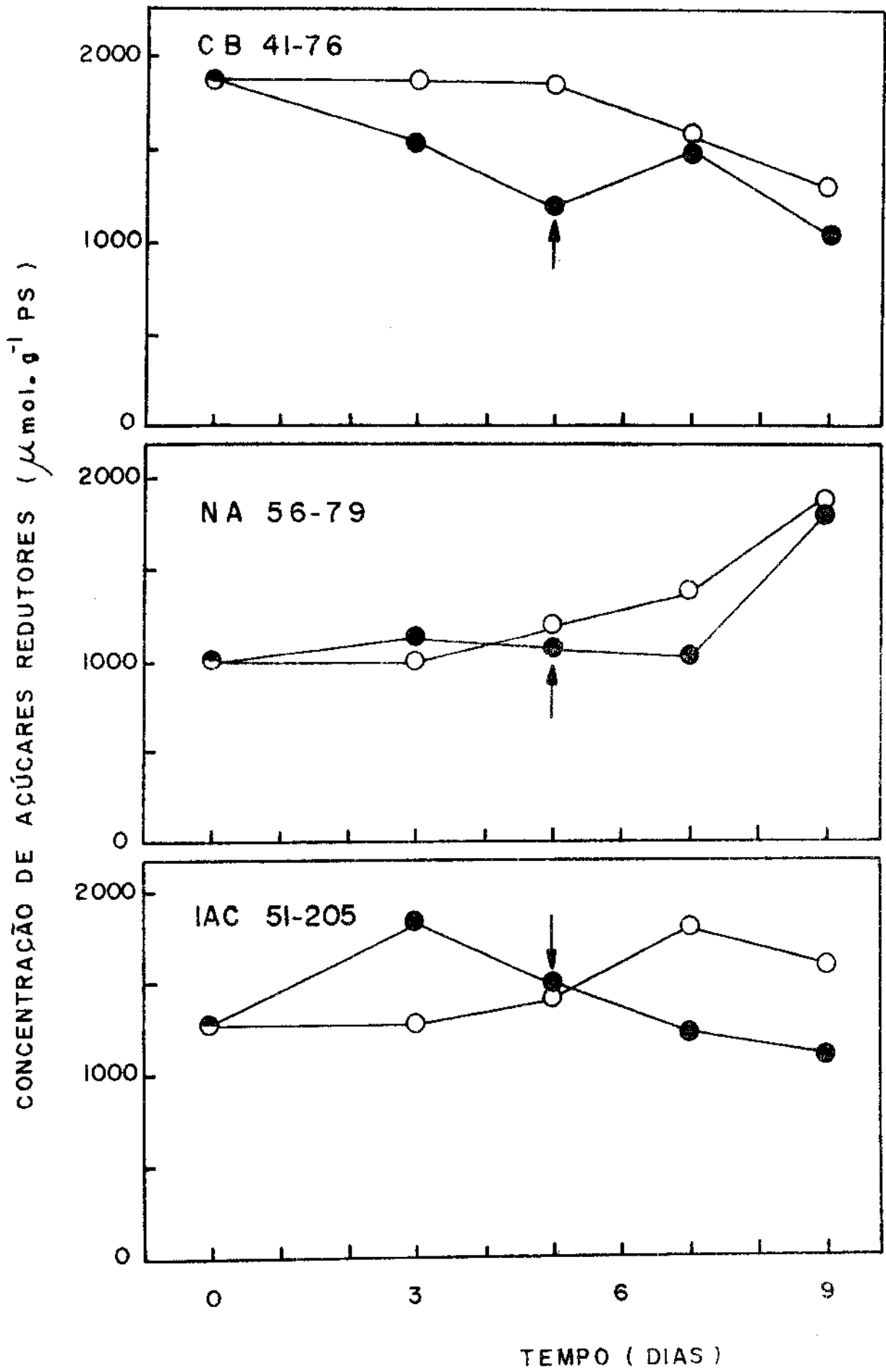
Observa-se na Figura 30, que o conteúdo de açúcares redutores nos tecidos de lâmina foliar em crescimento aumentou nos primeiros três dias de estresse, em todas as variedades. Porém, no final do período de deficiência hídrica a concentração foi reduzida a níveis praticamente normais na variedade IAC 51-205, enquanto que nas outras variedades atingiu valores inferiores aos das plantas irrigadas normalmente. Nos tecidos de colmo em crescimento, os efeitos do estresse hídrico na concentração de açúcares redutores (Figura 31) foram semelhantes àqueles verificados no conteúdo de açúcares solúveis totais (Figura 27).

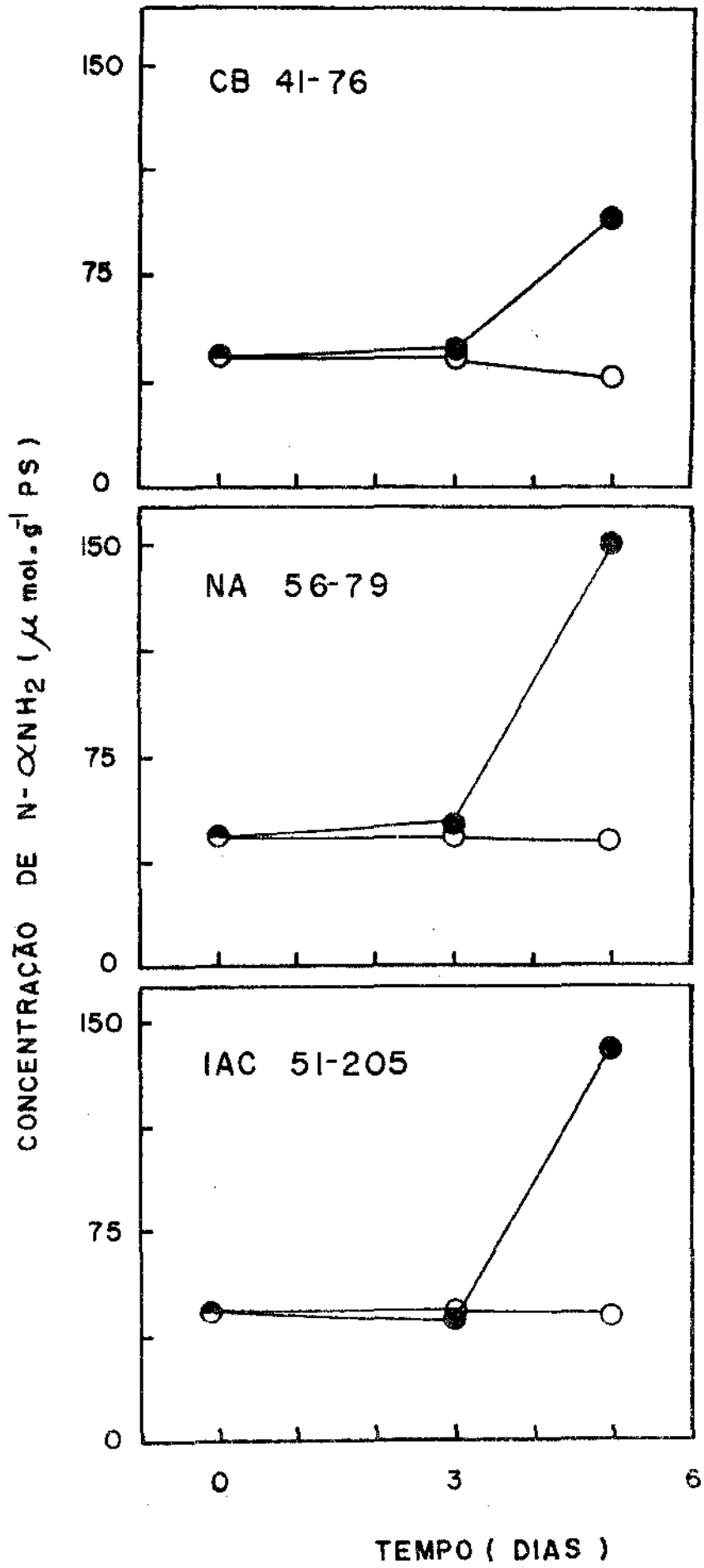
As concentrações de $N-\alpha NH_2$ nos tecidos completamente expandidos de lâmina foliar (Figura 32) e de bainha (Figura 33), e nos tecidos em expansão de lâmina foliar (Figura 34) e de colmo (Figura 35), aumentaram em todas as variedades e somente no período final de estresse, quando a desidratação nos tecidos foi mais severa.

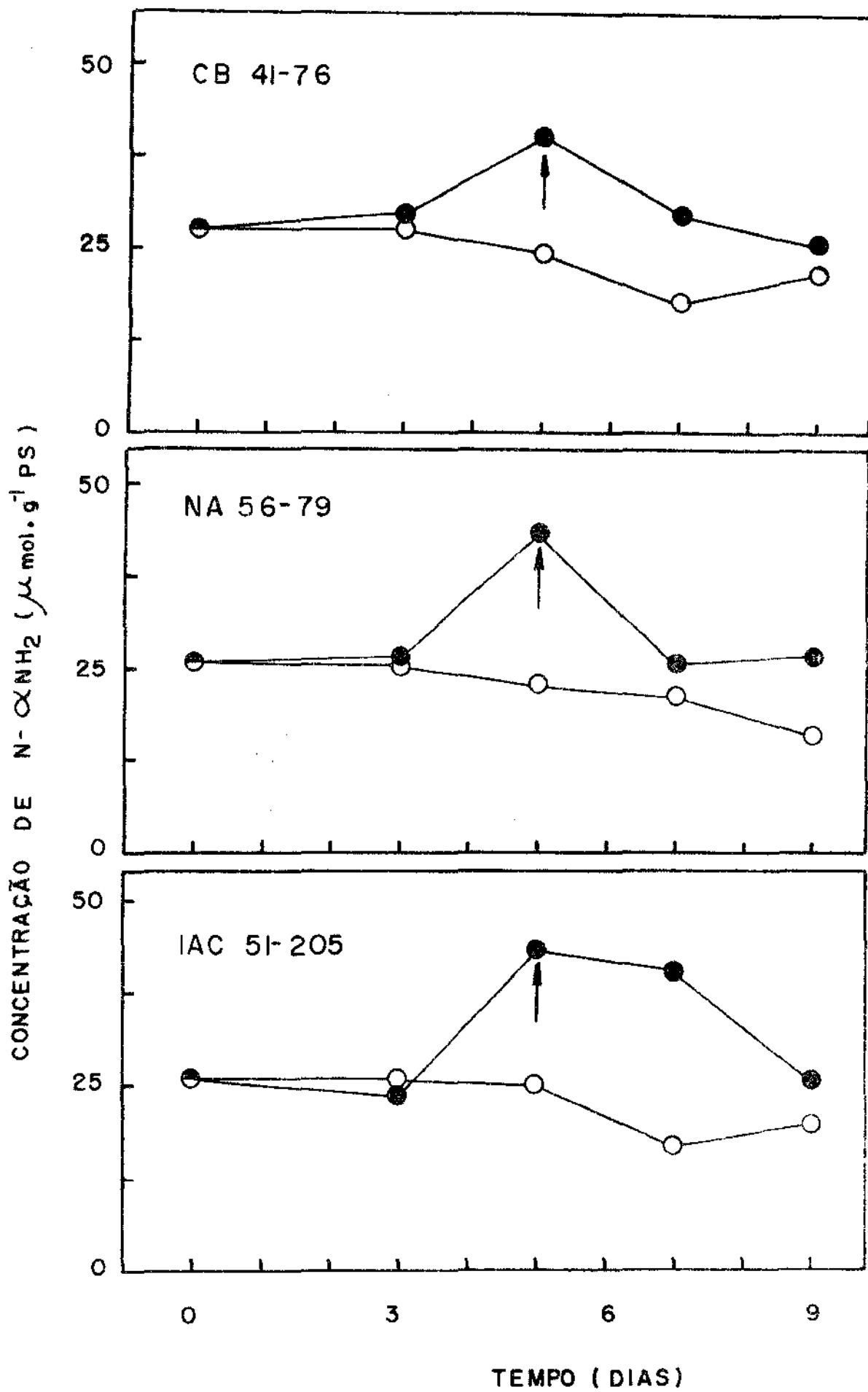
Nas primeiras 48 horas após a reirrigação, o teor de açúcares solúveis totais em tecidos de bainha completamente expandidos (Figura 25), elevou-se novamente atingindo níveis superiores àqueles observados nas plantas irrigadas normalmente, decrescendo no final do período de avaliação. Os teores de açúcares solúveis totais nos tecidos de lâmina foliar (Figura 26) e de colmo (Figura 27) em crescimento retornaram a níveis normais nas primeiras 48 horas de reirrigação, em todas as variedades com exceção da variedade IAC 51-205, na qual o conteúdo destes açúcares na lâmina foliar foi normalizado so

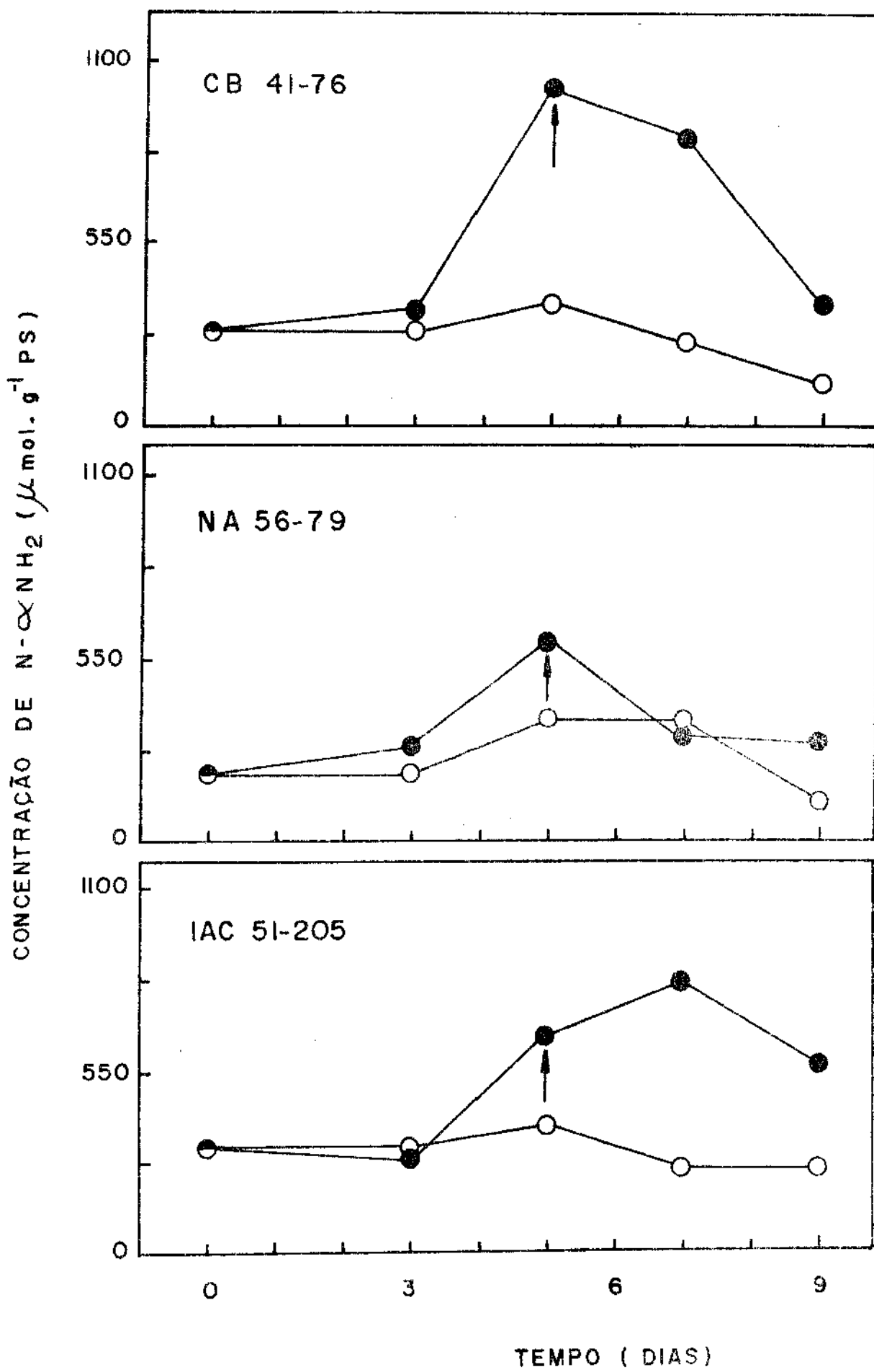


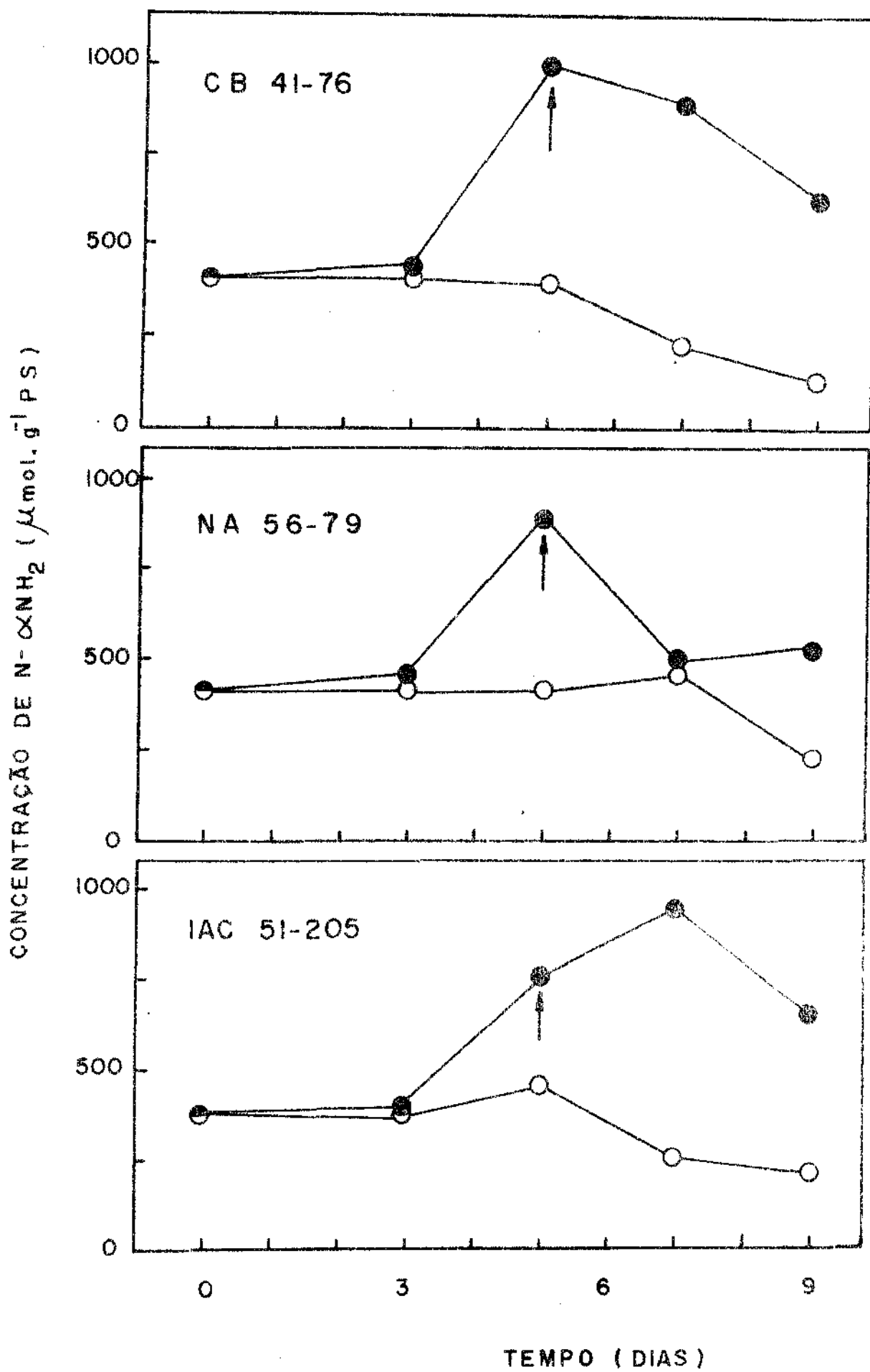












mente no final do período de recuperação.

O conteúdo de açúcares redutores nos tecidos de bainha completamente expandidos (Figura 29) foi normalizado somente depois de 48 horas de reirrigação, reduzindo-se a níveis inferiores ao controle no final do período de avaliação. Nos tecidos de lâmina foliar em expansão a recuperação do conteúdo de açúcares redutores (Figura 30) ocorreu nas primeiras 48 horas de reirrigação na variedade NA 56-79, entre 48 e 96 horas na variedade IAC 51-205 e provavelmente depois de 96 horas na variedade CB 41-76. Quanto aos tecidos de colmo em crescimento (Figura 31) observou-se que a normalização no conteúdo de açúcares redutores ocorreu nas primeiras 48 horas de reirrigação na variedade CB 41-76, e no final do período de avaliação na variedade NA 56-79. Entretanto, na variedade IAC 51-205 houve uma tendência de queda no conteúdo de açúcares redutores durante o período de reirrigação.

Quanto aos efeitos da reirrigação sobre os teores de $N-\alpha NH_2$, observou-se que a variedade NA 56-79 apresentou uma tendência de normalização nas primeiras 48 horas, ocorrendo uma elevação no período seguinte, em todos os tecidos estudados (Figuras 33, 34 e 35). Entretanto, as outras variedades apresentaram, no final do período de avaliação da recuperação, uma tendência de normalização nos tecidos de bainha completamente expandidos (Figura 33) e de elevação nos tecidos de lâmina foliar (Figura 34) e de colmo (Figura 35) em crescimento.

Devido à grande variabilidade verificada nos dados de análises químicas, não foi possível realizar uma interpretação precisa das diferenças observadas entre as variedades e

entre os diferentes tecidos, e também das relações existentes entre as alterações nas atividades invertásicas e no conteúdo de carboidratos durante os períodos de estresse hídrico e recuperação.

A estimativa do conteúdo de sacarose pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores não é recomendável, principalmente nas plantas em fase de intenso crescimento vegetativo, devido ao baixo conteúdo de sacarose em comparação com a elevada concentração de açúcares redutores, que acabam mascarando os valores determinados.

Conforme foi discutido anteriormente, o grau de comprometimento dos processos metabólicos e biofísicos que controlam os níveis de carboidratos e de $N-\alpha NH_2$ nos tecidos de plantas estressadas, depende da severidade da deficiência hídrica imposta, do tipo de tecido e da variedade.

Em condições de estresse hídrico moderado (meio do período de estresse) ocorreu um aumento ou diminuição na concentração de açúcares solúveis totais e no conteúdo de açúcares redutores. Porém com o aumento da severidade do estresse, nos tecidos onde ocorreu acúmulo de açúcares solúveis totais e redutores durante a fase moderada de deficiência hídrica, os teores destes carboidratos tenderam a ser normalizados, ou eventualmente decresceram, em todas as variedades.

Nas variedades NA 56-79 e CB 51-205, a queda no conteúdo de açúcares solúveis totais (Figura 24) e o acúmulo de açúcares redutores (Figura 28), em tecidos de lâmina foliar completamente expandidos de plantas estressadas, sugere a ocorrência de um decréscimo na concentração de sacarose devido a

redução na capacidade fotossintética das plantas. Na variedade CB 41-76 a diminuição no teor de açúcares solúveis totais na lâmina foliar completamente expandida (Figura 24) foi acompanhada pelo decréscimo no conteúdo de açúcares redutores (Figura 28) decorrente provavelmente do efeito depressivo da deficiência hídrica na atividade das invertases (Figuras 16 e 17), principalmente no final do período do estresse.

As considerações feitas anteriormente sobre atividades invertásicas e ajustamento osmótico, nos tecidos em expansão e completamente expandidos de plantas estressadas, são reforçadas pelos resultados das determinações do conteúdo de açúcares solúveis, especialmente os redutores, expressos com base no peso seco dos tecidos.

A elevação da atividade das invertases ácida e neutra em tecidos de lâmina foliar (Figuras 16 e 17) e de bainha (Figuras 18 e 19) completamente expandidos foi geralmente seguida por um aumento no conteúdo de açúcares redutores (Figuras 28 e 29), o que fortalece a hipótese sobre o papel das invertases no ajustamento osmótico dos tecidos em processo de senescência induzido pelo estresse hídrico (VIEIRA DA SILVA, 1970, 1976; ADJAHOSSOU, 1983). Por outro lado, em plantas com deficiência hídrica, a tendência de decréscimo da concentração de açúcares redutores nos tecidos de lâmina foliar (Figura 30) e de colmos (Figura 31) em crescimento foi também correlacionada com a redução nas atividades invertásicas nestes tecidos (Figuras 20 a 23).

De modo geral, a recuperação das atividades invertásicas após o fornecimento de água às plantas previamente estressadas foi acompanhada por uma tendência de normalização do

conteúdo de açúcares redutores, em todos os tecidos e variedades.

O acúmulo de N- α NH₂, verificado em todos os tecidos e variedades, foi provavelmente decorrente do aumento na atividade de enzimas proteolíticas induzido pelo estresse hídrico (VIEIRA DA SILVA, 1970; TODD, 1972; VIEIRA DA SILVA, 1976; NAYEK et al., 1982). Entre os compostos N- α NH₂ acumulados, a prolina, asparagina e glutamina parecem ser os mais importantes (MUNNS et al., 1979; FORD, 1984; KOEHLER et al., 1982; HANDA et al., 1983). Ao contrário dos açúcares redutores, o acúmulo de N- α NH₂ ocorreu somente quando cessou o crescimento da folha (Figura 15). A acumulação de N- α NH₂ pode ser também uma forma de armazenamento de carbono e nitrogênio reduzido durante o estresse (HSIAO, 1973).

KOEHLER et al., 1982 verificaram em plantas de cana-de-açúcar, que além dos açúcares solúveis e de N- α NH₂, o potássio e os ácidos orgânicos também contribuem para o abaixamento do potencial osmótico em tecidos foliares desidratados.

Foi verificado em plantas de trigo (WARDIAN, 1967; MUNNS et al., 1979) e de cana-de-açúcar (HARTT e KORTSCHAK, 1962; HARTT, 1967) que, dependendo da severidade do estresse hídrico, o transporte de substâncias orgânicas diminui mas não cessa completamente. A hidrólise de macromoléculas parece exercer um papel importante na acumulação de açúcares e aminoácidos nos tecidos estressados. Entretanto, esta acumulação nos tecidos encartuchados em crescimento, pode ser consequência, também, da remobilização de substratos dos tecidos completamente expandidos da lâmina foliar e bainha (MUNNS et al., 1979).

2.4. Alterações nas atividades invertásicas e nas concentrações de carboidratos solúveis e de $N-\alpha NH_2$ em tecidos em crescimento e completamente expandidos de plantas submetidas a estresse hídrico: fase de acumulação de sacarose.

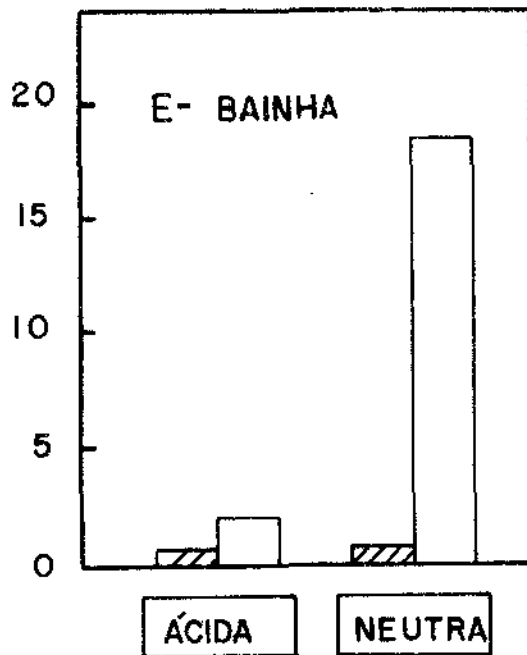
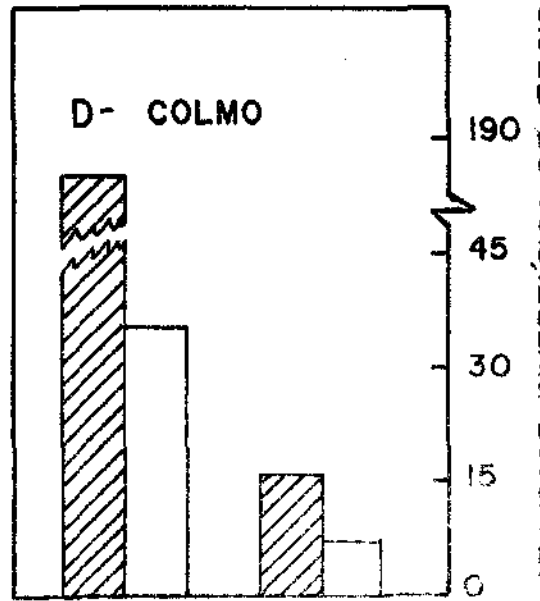
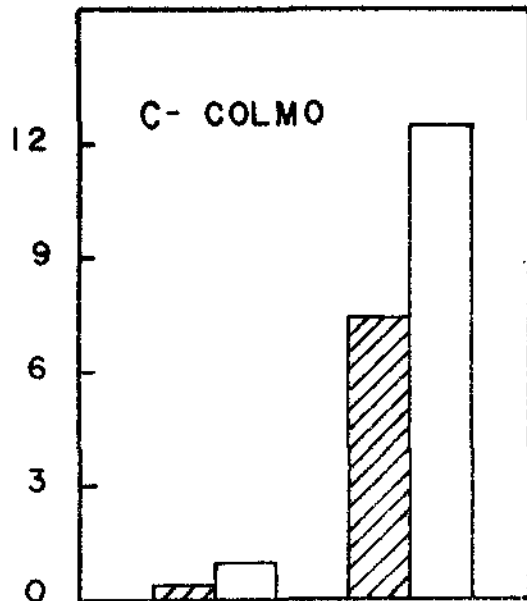
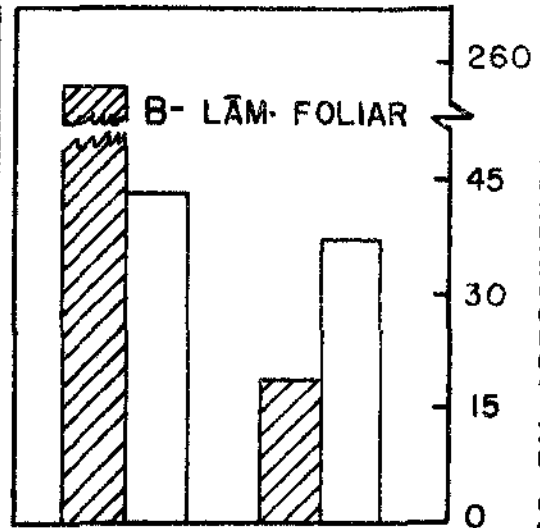
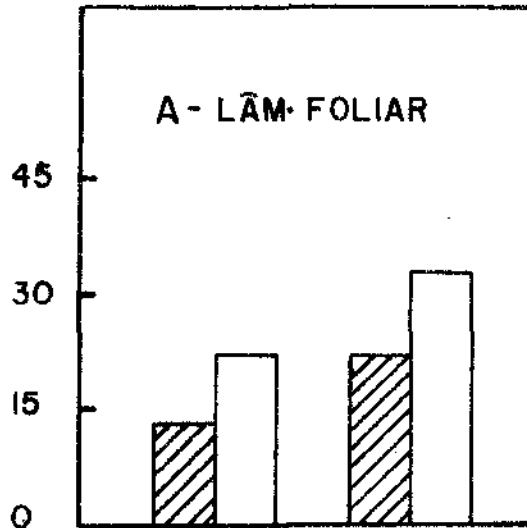
Neste estudo as plantas foram separadas em dois grupos, um mantendo-se o fornecimento de água normal e outro suprimindo-se a irrigação, correspondendo ao tratamento de estresse hídrico. As atividades das invertases e as dosagens químicas foram determinadas quando o potencial hídrico das folhas atingiu cerca de $-1,8$ e $-0,5$ MPa, respectivamente, nas plantas com limitação na disponibilidade de água e mantidas sob irrigação normal.

Nas plantas da variedade NA 56-79 em fase de acumulação de sacarose, os efeitos do estresse hídrico nas atividades invertásicas (Figura 36) e nos conteúdos de açúcares solúveis e de $N-\alpha NH_2$ (Figura 37) foram muito semelhantes àqueles ocorridos nas plantas em fase de intenso crescimento vegetativo (Figuras 16 a 23). São destacados apenas, as diferenças mais relevantes das alterações bioquímicas ocorridas nas duas fases de desenvolvimento estudadas.

2.4.1. Atividades das invertases ácida e neutra.

A diferença mais evidente entre as atividades invertásicas das plantas, nos dois estádios de desenvolvimento, ocorreu nos tecidos de lâmina foliar em crescimento. Enquanto a atividade da invertase neutra nas plantas jovens foi reduzi

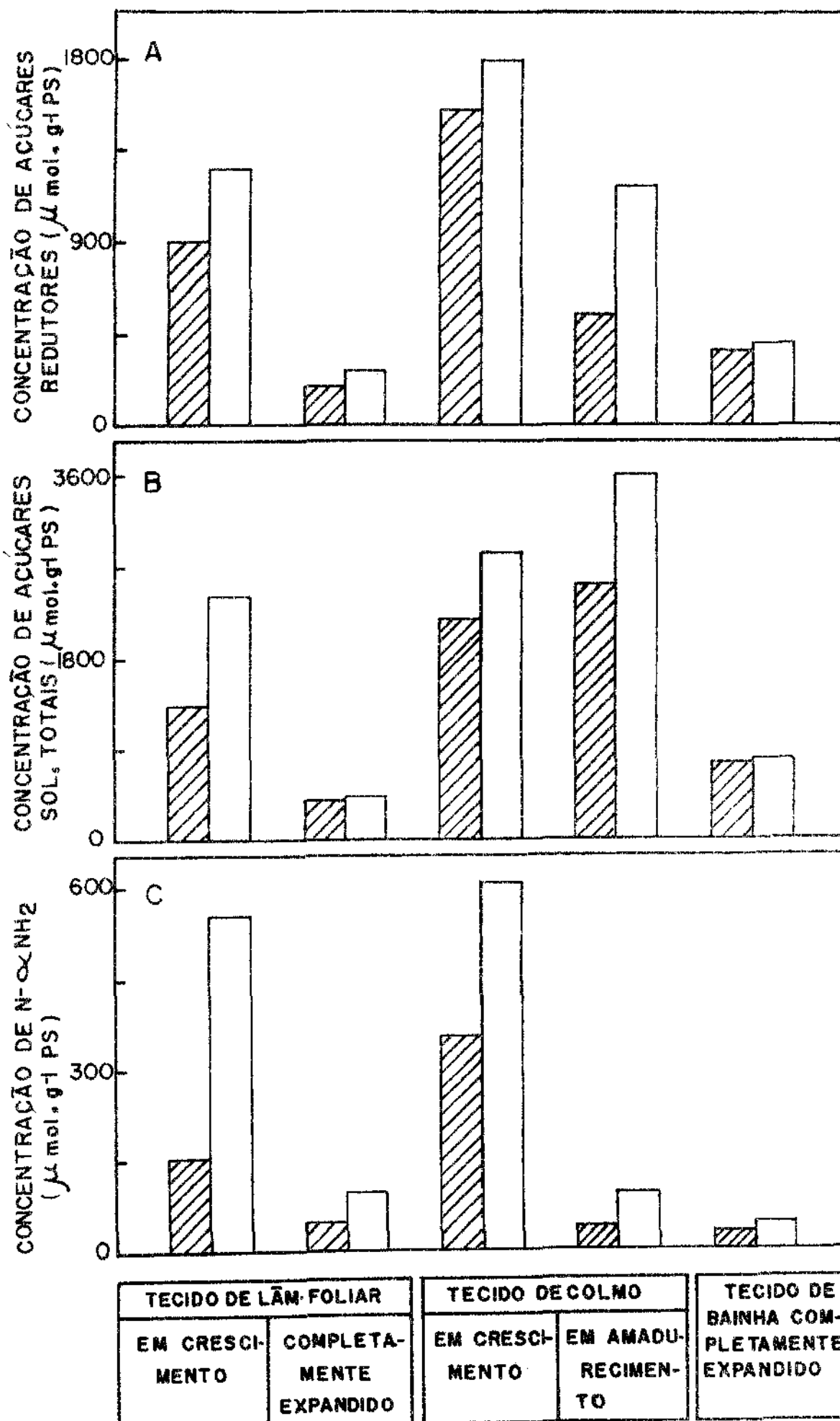
ATIVIDADE INVERTÁSICA DE TECIDOS COMPLETAMENTE EXPANDIDOS
 ($\mu\text{mol de AR} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS} \cdot \text{h}^{-1}$)



ÁCIDA

NEUTRA

ATIVIDADE INVERTÁSICA DE TECIDOS EM CRESCIMENTO
 ($\mu\text{mol de AR} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS} \cdot \text{h}^{-1}$)



da à metade pelo estresse hídrico (Figura 21), nas plantas na fase de acumulação de sacarose a atividade dessa invertase dobrou (Figura 36B). A resposta ao estresse hídrico da invertase neutra nos tecidos de lâmina foliar em crescimento de plantas em fase de maturação de colmos, foi semelhante àquela ocorrida nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos (Figura 36A).

As atividades invertásicas determinadas nos tecidos de bainha completamente expandidos de plantas jovens (Figuras 18 e 19) foram menores que nos tecidos de plantas em fase de maturação de colmos (Figura 36 E), tanto nas plantas irrigadas normalmente como nas estressadas. Por outro lado, as atividades invertásicas, nos tecidos de lâmina foliar em crescimento e completamente expandidos, e nos tecidos de colmo em expansão de plantas jovens (Figura 16, 17, 20, 21, 22 e 23), foram maiores que aquelas alcançadas pelas plantas em fase de acumulação de sacarose (Figuras 36A, 36B e 36 D). Estas maiores atividades nos tecidos de plantas jovens deve-se, provavelmente, à maior demanda metabólica de monossacarídeos, especialmente nas regiões de crescimento.

Quanto ao efeito do estresse hídrico nas atividades invertásicas do colmo em fase de maturação (Figura 36C), verificou-se uma elevação de aproximadamente 2,5 e 1,7 vezes, respectivamente, nas atividades das isoenzimas ácida e neutra. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por HATCH e GLASZIOU (1963).

2.4.2. Concentrações de açúcares solúveis e de N- α NH₂.

Com exceção da queda no conteúdo de açúcares solúveis totais, verificada somente nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos de plantas jovens (Figura 24), os efeitos do estresse hídrico sobre os conteúdos de açúcares solúveis totais (Figura 37B) e redutores (Figura 37A), nos tecidos completamente expandidos de lâmina foliar e bainha de plantas em fase de maturação, foram semelhantes àqueles ocorridos nas plantas jovens (Figuras 25, 28 e 29). O conteúdo de açúcares solúveis totais (Figura 37B) e redutores (Figura 37A), nos tecidos de colmo em amadurecimento, aumentou nas plantas estressadas.

Os efeitos da deficiência hídrica sobre os conteúdos de açúcares solúveis totais (Figura 37B) e redutores (Figura 37A), nos tecidos em crescimento de plantas em fase de acumulação de sacarose, foram semelhantes àqueles de plantas jovens, somente quanto o estresse hídrico foi moderado (Figuras 26, 27, 30 e 31). Entretanto, com o aumento na severidade do estresse nas plantas jovens, os efeitos tenderam a se invertirem, reduzindo o conteúdo de açúcares a níveis iguais ou inferiores aos normais.

Analisando os resultados do conteúdo de sacarose estimado (Tabela III) observou-se que ocorreu um aumento deste dissacarídeo nos tecidos em crescimento nas plantas estressadas. Todavia, nos tecidos expandidos, ocorreu apenas uma tendência de queda na lâmina foliar e de elevação nos tecidos de

TABELA III - Conteúdo de sacarose estimado ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$) nos tecidos de lâmina foliar e colmo em crescimento, de lâmina foliar e bainha completamente expandidos e de colmo em amadurecimento. Média de seis repetições.

PLANTAS	TECIDO DE LÂMINA FOLIAR		TECIDO DE COLMO		TECIDO DE BAINHA COMPLETAMENTE EXPANDIDO
	EM CRESCIMENTO	COMPLETAMENTE EXPANDIDO	EM CRESCIMENTO	COMPLETAMENTE EXPANDIDO	
IRRIGADAS	209 \pm 49	114 \pm 29	310 \pm 71	992 \pm 224	142 \pm 36
ESTRESSADAS	576 \pm 85	79 \pm 24	540 \pm 92	1281 \pm 319	166 \pm 16

Os resultados apresentados acima representam os valores médios e os respectivos desvios padrões.

bainha e de colmo.

O acúmulo de sacarose nos tecidos em crescimento de plantas estressadas está relacionado com a redução na atividade das invertases (Figuras 36B e 36D). Analisados conjuntamente, o acúmulo de sacarose observado e o aumento da concentração de açúcares redutores (Figura 37A), provavelmente são decorrentes da menor demanda metabólica destes tecidos sob condições de estresse hídrico.

Nos tecidos de lâmina foliar completamente expandidos a tendência de queda no conteúdo de sacarose estimado (Tabela III) e o acúmulo de açúcares redutores (Figura 37A) nas plantas estressadas estão associadas com o aumento nas atividades invertásicas (Figura 36A) (SINGH e REDDY, 1980) e, provavelmente, com a queda na fotossíntese.

O conteúdo de sacarose estimado tendeu a aumentar, ainda que não significativamente, nos tecidos de bainha completamente expandidos e de colmo em amadurecimento nas plantas estressadas (Tabela III). A tendência de maior acúmulo de sacarose nos colmos em amadurecimento de plantas estressadas está de acordo com os resultados obtidos por HARTT (1967) e COSNELL e LONSDALE (1974), e em discordância com os aumentos nas atividades invertásicas nestes tecidos (Figura 36C). Porém, como as atividades invertásicas nos colmos foram muito baixas, a manutenção de um pequeno fluxo de sacarose seria suficiente para compensar ou mesmo superar o aumento na capacidade dos tecidos estressados em hidrolizar sacarose. HARTT, (1967) salientou que, durante a fase de amadurecimento, o aumento no armazenamento de sacarose no colmo, sob condições li

mitantes de disponibilidade de água, pode ser devido à menor hidrólise de sacarose durante a translocação, à menor demanda de açúcares para o crescimento, e também ao transporte mais lento da sacarose dos sítios de transporte no floema para o parênquima de armazenamento no colmo. Segundo aquele autor, a não ser que o estresse hídrico seja muito severo, nenhum outro argumento fisiológico poderia ser contrário à eliminação da irrigação como um fator benéfico para o processo de maturação da cana-de-açúcar.

Os efeitos da deficiência hídrica sobre a concentração de $N-\alpha NH_2$ nos tecidos de plantas durante a fase de amadurecimento (Figura 37C) foram muito semelhantes àqueles ocorridos nas plantas jovens (Figuras 32 a 35).

IV - RESUMO

Foram realizados dois experimentos: o primeiro utilizando-se plantas de três variedades de cana-de-açúcar (NA 56-79, IAC 51-205 e CB 41-76) com diferentes graus de resistência à seca e em fase de intenso crescimento vegetativo (plantas com aproximadamente 2 meses de idade). O outro experimento foi realizado com plantas da variedade NA 56-79 durante a fase de acumulação de sacarose (maturação dos colmos). Quando as plantas atingiram a idade fisiológica pretendida em cada experimento, a restrição hídrica foi imposta pela supressão da irrigação. No experimento com plantas em fase de intenso crescimento foi avaliada a recuperação do estresse hídrico.

Neste trabalho foram determinadas também as condições mais apropriadas de ensaio da redutase de nitrato em tecidos foliares e das invertases em tecidos ontogeneticamente diferentes.

A atividade da redutase de nitrato diminuiu suavemente com os decréscimos no potencial hídrico da folha e na taxa de transpiração, até determinado limite, quando então foi reduzida abruptamente. O fluxo de nitrato para as folhas, via corrente transpiratória, parece exercer um papel importante na regulação do nível de atividade da redutase de nitrato em cana-de-açúcar.

O conteúdo de água nos tecidos em expansão e completamente expandidos, o potencial hídrico da folha e a taxa de crescimento foliar diminuíram com a supressão da irrigação. Com a reirrigação das plantas estressadas observou-se a nitroga

da do crescimento foliar e, que o potencial hídrico da folha retomou seus valores normais mais rapidamente que o conteúdo de água, em todos os órgãos e variedades estudados.

Foram caracterizadas duas isoenzimas de invertase nos tecidos foliares e de colmo das plantas de cana-de-açúcar, variedade NA 56-79. Uma isoenzima ácida com máxima atividade em pH 5,5, e predominante em tecidos em crescimento, e outra neutra com um máximo de atividade em pH 7,0, e com predominância em tecidos completamente expandidos.

As atividades das invertases ácida e neutra aumentaram nos tecidos completamente expandidos de lâmina foliar e bainha nas plantas estressadas das variedades NA 56-79 e IAC 51-205. Nos tecidos em expansão de lâmina foliar e colmo as atividades das invertases foram reduzidas nas plantas estressadas das variedades estudadas. O padrão de recuperação de cada isoenzima variou com o tipo de tecido e órgão da planta e também com a variedade estudada.

Enquanto o conteúdo de $N-\alpha NH_2$ aumentou em todos os tecidos e órgãos de plantas estressadas em todas as variedades, o mesmo não ocorreu com o conteúdo de açúcares solúveis totais e redutores, que apresentaram respostas diferentes para cada tecido e órgão da planta, bem como, para cada variedade e nível de restrição hídrica imposto. Por outro lado, a normalização nos níveis de açúcares nas plantas reirrigadas deu-se rapidamente, enquanto que os níveis de $N-\alpha NH_2$ apresentou somente tendências de normalização durante o período de avaliação da recuperação em todos os tecidos, órgãos e variedades estudados.

Os efeitos do estresse hídrico nas atividades invertásicas e nos conteúdos de açúcares solúveis e de $N-\alpha NH_2$ nas plantas da variedade NA 56-79, em fase de acumulação de sacarose, foram muito semelhantes àqueles ocorridos nas plantas em fase de intenso crescimento vegetativo, na mesma variedade. Nas plantas em fase de maturação, o estresse hídrico aumentou o conteúdo de sacarose estimado nos tecidos em crescimento. Todavia, nos tecidos expandidos, ocorreu apenas uma tendência de queda na lâmina foliar e de elevação nos tecidos de bainha e de colmo de plantas estressadas.

De modo geral, a maior tolerância ao estresse hídrico da variedade IAC 51-205 em comparação com a maior sensibilidade da variedade CB 41-76 e tolerância intermediária da variedade NA 56-79, observada visualmente, pode ser confirmada pela maioria dos parâmetros avaliados durante o período de indução e de recuperação do déficit hídrico.

V - ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL BEHAVIOUR OF SUGARCANE PLANTS (Saccharum sp)
UNDER CONDITION OF WATER STRESS: CHANGES IN NITRATE ASSIMILA
TION AND SUGAR MOBILIZATION.

Two experiments were carried out: in the first one there were utilized sugarcane plants of three varieties (NA 56-79, IAC 51-205 and CB 41-76) with different degrees of drought resistance, in the phase of intensive vegetative growth (ca 2 month old); the second experiment included plants of the variety NA 56-79, in the sucrose accumulating phase (culm maturation).

Water stress to the plants was imposed by withholding irrigation, at times the plants reached the proper physiological age defined in each experiment.

The patterns of recovery of the plants from water stress were followed with plants in the vegetative phase of growth.

Estimation of nitrate reductase activity was done in leaf tissue and invertase activities assays were carried out in different plant tissues and organs, i.e. developing leaves (lamina) and mature lamina and sheaths, and culm internodes throughout ontogenesis. The appropriate conditions for enzyme assays, in the particular tissues and organs, were established.

The concentrations of total soluble sugars, reducing sugars and α -amino nitrogen, of the various plant parts, were calculated at different times during the induction of and recovery from water stress.

The results showed that, at mild water stress, nitrate reductase activity fell slowly with the decrease of leaf water potential and transpiration rate. As the level of water energy diminished the process of nitrate reduction reached a threshold where the enzyme was severely inhibited.

In sugarcane, it appeared that the nitrate flux to the leaves, in the transpiration stream, exerted an important role in the regulation of nitrate reductase activity.

The water content in the tissues, the growth rate and the leaf water potential decreased as the moisture availability in the soil was lowered. Upon irrigation, leaf growth resumed and the values of water potential increased faster than the water content of the different tissues and organs.

In the variety NA 56-79, the leaf and culm invertases were shown to present two isoenzyme activities: an acid invertase, with optimum pH around 5.5, occurring predominantly in growing tissues; a neutral invertase, pH optimum 7.0, found mainly in mature tissues.

In the varieties NA 56-79 and IAC 51-205, water stress caused an increase of both acid and neutral invertase activities in the lamina and sheaths of expanded leaves. On the contrary, invertase activities decreased in growing leaves and culms under conditions of water shortage. The pattern of recovery of each isoenzyme upon irrigation varied with the tissue and organ analyzed, and with the variety considered.

Under water stress the amino nitrogen content increased in all tissues and organs, in the three varieties.

On the other hand, the concentration of total soluble sugars and reducing sugars was changed with the level of imposed water restriction, in every tissue and organ, in all varieties.

When the plants were rewatered the sugar levels in the tissues and organs rapidly increased and reached the values of the continuously hydrated plants, while the amino nitrogen content showed only a slight tendency of recovery during the time of the experiment.

The results have indicated that, in stressed plants of the variety NA 56-79, soluble sugars and amino nitrogen contents were similarly affected in both vegetative and mature phases of plant in both vegetative and mature phases of plant growth.

Expanding tissues of maturing plants showed an increase of sucrose content when subjected to water stress. However, in mature organs, drought induced a decreasing trend of sucrose accumulation in the lamina which was paralleled by an increased concentration in the sheaths and culms.

The evaluation of the various physiological and biochemical parameters utilized in the experiments of water stress and recovery, permitted to discriminate the variety IAC 51-205 as the most drought tolerant, NA 56-79 as intermediate, and CB 41-76 as the most susceptible variety.

VI - LITERATURA CITADA

- ACEVEDO, E.; HSIAO, T. C. & HENDERSON, D. W. 1971. Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status. Plant Physiol., 48: 631-636
- ACEVEDO, E.; FERERES, E.; HSIAO, T. C. & HENDERSON, D. W. 1979. Diurnal growth trends, water potential, and osmotic adjustment of maize and sorghum leaves in the field. Plant Physiol., 64: 476-480
- ACKERSON, R. C. & HEBERT; R. R. 1981. Osmoregulation in cotton in response to water stress. I. Alterations in photosynthesis, leaf conductance, translocation, and ultrastructure. Plant Physiol., 67: 484-488.
- ADJAHOSSOU, D. F. 1983. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq). These de Doctorat. L'Universite Paris VII. 203p.
- ALEXANDER, A. G. 1965. Behavior of enzymes governing starch- and-sacrose forming supplied with variable nitrate and phosphate in sand culture. J. Agr. Univ. Puerto Rico, 69: 153-171.
- ALEXANDER, A. G. 1965. Physiological studies of enzymes catalyzing the synthesis and hydrolysis of sucrose, starch and phosphorylated hexose in sugar cane. J. Agr. Univ. Puerto Rico, 49: 60-75.
- ALEXANDER, A. G. 1973. Sugar translocation. In: Alexander A. G. (Aut.). Sugar-cane Physiology. 752p.

- ANGELOCCI, L. R. 1983. Respostas de plantas jovens de Coffea arabica L. e de Coffea canephora Pierre às variações do fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas, SP. 150p.
- ASLAM, M.; HUFFAKER, R. C. & RAINS D. W. 1984. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. Plant Physiol., 76: 321-325.
- BARDZIK, J. M.; MARSH Jr, H. V. & HAVIS, J. R. 1971. Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. Plant Physiol., 47: 828-831.
- BARNETT, N. M. & NAYLOR, A. W. 1966. Amino acid and protein metabolism in Bermuda Grass during water stress. Plant Physiol., 41: 1222-1230.
- BARTA, A. L. 1975. Effect of nitrogen nutrition on distribution of photosynthetically incorporated $^{14}\text{CO}_2$ in Lolium perenne. Can. J. Bot., 53: 237-242.
- BASSIONI, N. H. 1971. Temperature and pH in NO_3^- uptake. Plant Soil, 35: 445-448.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R. H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20: 495-522.
- BEEVERS, L.; SCHRADER, L. E.; FLESCHER, D. & HAGEMAN, R. H. 1965. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. Plant Physiol., 40: 691-698.

- BENZIONI, A. & HEIMER, Y. M. 1977. Temperature effect on nitrate reductase activity in vivo. Plant Sci. Lett., 9: 225-231.
- BIELORAI, H. & HOPMANS, P. A. M. 1975. Recovery of leaf water potential, transpiration and photosynthesis of cotton during irrigation cycles. Agron. J., 67: 629-632.
- BOYER, J. S. 1967. Leaf water potentials measured with a pressure chamber. Plant Physiol., 42: 133-137.
- BOYER, J. S. 1969. Measurement of the water status of plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20: 351-364.
- BOYER, J. S. 1970a. Differing sensitivity of photosynthesis to low leaf water potential in corn and soybean. Plant Physiol., 56: 236-239.
- BOYER, J. S. 1970b. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. Plant Physiol., 46: 233-235.
- BOYER, J. S. 1971a. Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low leaf water potential. Plant Physiol., 47: 816-820.
- BOYER, J. S. 1971b. Resistances to water transport in soybean, bean, and sunflower. Crop. Sci., 11: 403-407.
- BOYER, J. S. 1976. Water deficits and photosynthesis. In: Kozlowski, T. T. (ed.). Water deficits and plant Growth. v. 4. Academic Press, New York.

- BRINHOLI, O. 1975. Resistência à seca de algumas variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp) Tese de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 48p.
- BRUNINI, O. 1980. Recuperação no potencial da água em folhas de cafeeiros após um "stress" de água severo. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 89, Resumos. IBC-GERCA p. 111-112.
- CARELLI, M. L. C. 1979. Partição da atividade da redutase do nitrato durante o desenvolvimento de plântulas de soja (Glycine max L. merr.) Tese de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 78p.
- CATALDO, D. A; HAROON, M; SCHRADER, L. E. & YOUNGS, V. L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Analysis, 6: 71-80.
- CHIRANJIVI RAO, K. & VIJAYASARADHY, M. 1980. Nitrate reductase (NRA) at vegetative and reproductive conditions in Saccharum (CULTIVAR CO 285). In: 17th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 432-437.
- FAHL, J. I. & CARELLI, M. L. C. 1984. Fotossíntese e redutase de nitrato em plantas de cana-de-açúcar. In: 36ª Reunião Anual da S. B. P. C. Resumos, 36(7): 9-10.
- FISCHER, R. A.; HSIAO, T. C. & HAGAN, R. M. 1970. After effect of water stress on stomatal opening. I. Techniques and Magnitudes. J. Exp. Bot., 21: 371-385.

- FLEISCHMACHER, O. L.; PRADO, F. E. & SAMPIETRO, A. R. 1980. Cell wall invertases from apex and callus tissues of sugar cane. Plant Cell Physiol., 21: 1273-1281.
- FORD, C. W. 1984. Accumulation of low molecular weight solutes in water-stressed tropical legumes. Phytochemistry, 23: 1007-1015.
- FRANK, A. B.; POWER, J. F. & WILLIS, W. O. 1973. Effect of temperature and plant water stress on photosynthesis diffusion resistance and leaf water potential in spring wheat. Agron. J., 65: 777-780.
- GARGANTINI, V. M. S. 1980. Produção e qualidade forrageira de Centrosema pubescens Benth. e Galactia striata D.C. cultivadas sob déficit hídrico cíclico, na fase de estabelecimento. Tese de Mestrado. UFV. Viçosa, MG. 67p.
- GAYLER, K. R. & GLASZIOU, K. T. 1972. Physiological function of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar cane. Physiol. Plant., 27: 25-31.
- GLASZIOU, K. T. & BULL, T. A. 1965. The relation between total invertase activity and internode expansion in sugar-cane stalks. In: 12th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings, p. 575-581.
- GLASZIOU, K. T. & GAYLER, K. R. 1972. Storage of sugar in stalks of sugar cane. Bot. Rev., 38: 471-490.

- GLOVER, J. 1959. The apparent behavior of maize and sorghum stomata during and after drought. J. Agric. Sci., 5: 412-416.
- GOSNELL, J. M. & LONSDALE. 1974. Some effects of drying off before harvest on cane yield and quality. In: 15th Congress of the International Society of the Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 701-712.
- GREENLAND, A. J. & LEWIS, D. H. 1981. The acid invertases of the developing third leaf of oat. II. changes in the activities of soluble isoenzymes. New Phytol., 88: 279-288
- HALLMARK, W. B. & HUFFAKER, R. C. 1978. The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in Sudangrass. Physiol. Plant., 44: 147-152.
- HANDA, S.; BRESSAN, R. A; HANDA, A. K.; CARPITA, N. C. & HASEGAWA, P. M. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. Plant Physiol., 73: 834-843.
- HARPER, J. E. & HAGEMAN, R. H. 1972. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (Glycine Max L. Merr.). Plant Physiol., 49: 146-154.
- HARTT, C. E. 1967. Effect of supply upon translocation and storage of ^{14}C in sugarcane. Plant Physiol., 42: 338-346.

- HARTT, C. E. 1970. Effect of nitrogen deficiency upon translocation of ^{14}C in sugarcane. Plant Physiol., 46: 419-422.
- HARTT, C. E. 1967. Effect of supply upon translocation and storage of ^{14}C in sugarcane. Plant Physiol., 42: 338-346.
- HARTT, C. E. & KORTSCHAK, H. P. 1962. Tracing sugar in the cane plant. In: 11th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p.323-332.
- HATCH, M. D. & GLASZIOU, K. T. 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationships of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plants growth in controlled environments. Plant Physiol., 38: 344-348.
- HATCH, M. D.; SACHER, J. A. & GLASZIOU, K. T. 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane. I. Studies on enzymes of the cycle. Plant Physiol., 38: 338-343.
- HAWKER, J. S. 1980. Invertases from leaves of Phaseolus vulgaris plants grown on nutrient solutions containing NaCl. Aust. J. Plant Physiol., 7: 67-72
- HAWKER, J. S. & HATCH, M. D. 1965. Mechanism of sugar storage by mature stem tissue of sugarcane. Physiol. Plant., 18: 444-453.
- HAWKER, J. S. & WALKER, R. R. 1978. Effect of sodium chloride on expansion rates and invertases activity of leaves. Aust. J. Plant Physiol., 5: 73-80.

- HELLEBUST, J. A. & FORWARD, D. F. 1962. The invertase of corn radicle and its activity in successive stages of growth. Can. J. Bot., 40: 113-126.
- HENSON, I. E.; MAHALAKSHMI, V.; BIDINGER, F. R. & ALAGARSWAMY G. 1982. Osmotic adjustment to water stress in pearl millet (Pennisetum americanum (L.) Leeke) under field conditions. Plant Cell Environ., 5: 147-154.
- HSIAO, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant Physiol., 24: 519-570.
- HUDSON, J. C. 1968. Available soil water and sugarcane growth and transpiration. In: 13th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 484-498.
- HUFFAKER, R. C.; RADIN, T.; KLEINKOPF, G. E. & COX, E. L. 1970. Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. Crop Sci., 10: 471-473.
- HUNT, R. 1978. Plant growth analysis. In: Arnold, E. (ed.). Studies in biology. n^o 96. Edward Arnold Limited. London. 67p.
- JORDAN, W. R. & HUFFAKER, R. C. 1972. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves. Physiol. Plant., 26: 296-301.

- KANNANGARA, C. G. & WOOLHOUSE, H. W. 1967. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of Perilla frutescens. New Phytol., 66: 553-561.
- KIRKHAM, M. B.; GARDNER, W. B. & GERLOFF, G. C. 1972. Regulation of cell division and cell enlargement by turgor pressure. Plant Physiol., 49: 961-962.
- KOEHLER, P. H.; MOORE, P. H.; JONES, C. A.; DELA CRUZ, A. & MARETZKI, A. 1982. Response of drip-irrigated sugarcane to drought stress. Agron. J., 74: 906-911.
- KOSHLAND, D. E. & STEIN, S. S. 1954. Correlation of bond breaking with enzyme specificity cleavage point of invertase J. Biol. Chem., 208: 139-148.
- KRAMER, P. J. 1983. Water relations of plants. New York, Academic Press. 489p.
- LYNE, R. L. & REES, T. AP. 1971. Invertase and sugar content during differentiation of roots of Pisum sativum. Phytochemistry, 10: 2593-2599.
- MAGALHÃES, A. C. 1975. Nitrate assimilation in higher plants. What's New in Plant Physiol., 7: 1-5.
- MAGALHÃES, A. C. & HAGEMAN, R. H. 1978. High temperature effects on net CO₂ exchange, nitrate reductase and RuDPCarboxylase activities in soybean leaves. Rev. Brasil. Bot., 1: 139-142.

- MAGALHÃES, A. C.; PETERS, D. B. & HAGEMAN, R. H. 1976. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (Glycine max L. Merr) seedlings. Plant Physiol. 58: 12-16.
- MARETZKI, A. & DELA CRUZ, A. 1967. Nitrate reductase in sugarcane tissues. Plant & Cell Physiol., 8: 605-611.
- MATTAS, R. E. & PAULI, A. W. 1965. Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (Zea mays L.) plants during heat and moisture stress. Crop Sci., 5: 181-184.
- MCCREE, K. J. & DAVIS, S. D. 1974. Effect of water stress and temperature on leaf size and on size and number of epidermal cells in grain sorghum. Crop Sci., 14: 751-755.
- MEGURO, N. E. & MAGALHÃES, A. C. 1982. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. Pesq. Agropec. Bras., 17: 1725-1731.
- MEGURO, N. E. & MAGALHÃES, A. C. 1983. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in Coffea arabica L. cultivars. J. Hort. Sci., 58: 147-152.
- MEYER, R. F. & BOYER, J. S. 1972. Sensitivity of cell division and cell elongation to low water potentials in soybean hypocotyls. Planta, 108: 77-87.
- MICHELENA, V. A. & BOYER, J. S. 1982. Complete turgor maintenance at low water potential in the elongating region of maize leaves. Plant Physiol., 69: 1145-1149.

- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-428.
- MONGELARD, J. C. 1968. The effect of different water regimes on the growth of two sugarcane varieties. In: 13th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 643-651.
- MORILLA, C. A.; BOYER, J. S. & HAGEMAN, R. H. 1973. Nitrate reductase activity and polyribosomal content of corn (Zea mays L.) having low leaf water potentials. Plant Physiol., 51: 817-825.
- MUNNS, R; BRADY, C. J. & BARLOW, E. W. R. 1979. Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. Aust. J. Plant Physiol., 6: 379-389.
- NAIDU, K. M.; VENKATARAMANA, S. & GURURAJA RAO, P. N. 1983. Varietal variation in stomatal conductance and diffusion resistance during moisture stress and recovery in sugar cane. In: 18th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 567-583.
- NAYEK, B.; BISWAS, A. Kr. & CHOUDHURI, M. A. 1982. Water stress-induced changes in enzymic activities with age and development of field-grown rice. Phyton, 42: 103-108.
- NAYLOR, A. W. 1972. Water deficits and nitrogen metabolism. In: Kozlowski, T. T. (ed.). Water deficits and plant Growth. vol. III. Academic Press. New York. p. 241-254.

- NEYRA, C. A. & HAGEMAN, R. H. 1978. Pathway for nitrate assimilation in Corn (Zea mays L.) leaves: Cellular distribution of enzymes and energy sources for nitrate reduction. Plant Physiol., 62: 618-621.
- PARTHASARATHI, K. 1966. Contributions to a biochemical study of sugarcane. 3. Nitrate reductase activity and potential nitrate, and their use in determining the relative yield capacity of cane varieties. Proc. Indian Acad. Sci., 64: 91-95.
- PARTHASARATHI, K. & RAMAKRISHNAN, S. 1964. Contributions to a biochemical study of sugarcane. 1. Potential nitrate and nitrate reductase in sugarcane and their possible relation to yield capacity. Proc. Indian Acad. Sci., 59: 110-116.
- PASSIOURA, J. B. 1980. The meaning of matric potential. J. Exp. Bot., 31: 1161-1169.
- PLAUT, Z. 1973. The effect of soil moisture tension and nitrogen supply on nitrate reduction and accumulation in wheat seedlings. Plant Soil, 38: 81-94.
- PLAUT, Z. 1974. Nitrate activity of wheat seedlings during exposure to and recovery from water stress and salinity. Physiol. Plant., 30: 212-217.
- POLLOCK, C. J. & LLOYD, E. J. 1977. The distribution of acid invertase in developing leaves of Lolium temulentum L. Planta, 133: 197-200.

- POLLOCK, C. J. & LLOYD, E. J. 1978. Acid invertase activity during senescence of excised leaf tissue of Lolium temulentum. Z. Pflanzenphysiol., 90: 79-84.
- PRADO, F. E.; SAMPIETRO, A. R. & VATTUONE, M. A. 1979. Ammonium heptamolybdate, an inhibitor of plant invertases. Phytochemistry, 18: 1799-1802.
- PRAKASH, S. S. & NAIK, M. S. 1982. Reevaluation of in vivo assay of nitrate reductase activity in wheat leaves. Plant Sci. Lett., 25: 9-14.
- RAVEN, J. A. & SMITH, F. A. 1980. Intracellular pH regulation in the giant-celled marine alga Chaetomorpha darwinii. J. Exp. Bot., 31: 1357-1369.
- RICARDO, C. P. P. 1974. Alkaline β -fructofuranosidase of tuberous roots: possible physiological functions. Planta, 118. 333-343.
- RICARDO, C. P. P. & REES, T. AP. 1970. Invertase activity during the development of carrot roots. Phytochemistry, 9: 239-247.
- ROBINSON, F. E. 1963. Soil moisture tension, sugarcane stalk elongation and irrigation interval. Agron. J., 55: 481-484.
- ROSARIO, E. L. & SOOKSATHAN, K. 1977. Influence of fertility levels on nitrate reductase activity and its significance to sugar yield. In: 17th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p.1825-1841.

- ROSSIELO, R. O. P.; FERNANDES, M. S. & FLORES, J. P.O. 1981. Efeito da deficiência hídrica sobre o crescimento e a acumulação de carboidratos solúveis de milho. Pesq. Agropec. Bras., 16: 561-666.
- RUSSO, M. T. 1983. Aspectos autoecológicos do processo de redução do nitrato em Eichhornia crassipes (mart) solms, (Aguapé). Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, SP. 69p.
- RUTHERFORD, P. P. 1981. Some biochemical changes in vegetables during storage. Ann. Appl. Biol., 98: 538-541.
- SACHER, J. A.; HATCH, M. D. & GLASZIOU, K. T. 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane. III. Physical & metabolic aspects of cycle in imature storage tissues. Plant Physiol., 38: 348-354.
- SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. & PRADO, F. E. 1980. A regulatory invertase from sugar cane leaf sheaths. Phytochemistry, 19: 1637-1642.
- SANTORO, L. G. 1979. Alterações da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento da folha de soja (Glycine max (L.) merr. Tese de Mestrado. UNICAMP. Campinas, SP. 89p.
- SANTOS FILHO, B. G. 1985. Parâmetros biofísicos e fisiológicos associados à economia de água em plantas de cana-de-açúcar (Saccharum spp) submetidas à estresse hídrico. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas, SP. 158p.

- SCHOLANDER, P. F.; HAMMEL, H. T.; BRADSTRETT, E. D. & HEMMINGSEN, E. A. 1965. Sap pressure in vascular plants. Science, 148: 339-346.
- SHANER, D. L. & BOYER, J. S. 1976a. Nitrate reductase activity in maize (Zea mays L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. Plant Physiol., 58: 499-504.
- SHANER, D. L. & BOYER, J. S. 1976b. Nitrate reductase activity in maize (Zea mays L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. Plant Physiol., 58: 505-509.
- SHAW, M. E. A. & INNES, R. F. 1965. The growth pattern and yield of annual cane planted at different seasons and the effects of nitrogen and irrigation treatments. In: 12th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p.401-428.
- SILVEIRA, J. A. G. 1980. Aspectos bioquímicos e fisiológicos da relação K/N em cana-de-açúcar (Saccharum sp) cv. NA 56-79 cultivada em solução nutritiva. Tese de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 127p.
- SINGH, S. & REDDY, M. S. 1980. Growth, yield and juice quality performance of sugarcane varieties under different soil moisture regimes in relation to drought resistance. In: 17th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings, p. 541-555.

- SRIVASTAVA, H. S. 1975. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedlings. Plant Cell Physiol., 16: 995-999.
- SUSUKI, J. 1982. Biossíntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (Saccharum spp): Influência do íon potássio durante diferentes estádios de crescimento em solução nutritiva. Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 96p.
- TANIMOTO, T. & NICKELL, L. G. 1965. Estimation of drought resistance of sugarcane varieties. In: 12th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 893-897.
- TINGEY, D. T.; FITES, R. C. & BAHARSJAH, J. 1974. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. New Phytol., 73: 21-29.
- TODD, G. W. 1972. Water deficits and enzymatic activity. In: Kozłowski, T. T. (ed.). Water deficits and plant growth. vol. III. Academic Press. New York. p. 177-216.
- TROUGHTON, J. H. 1979. Plant water status and carbon dioxide exchange of cotton leaves. Aust. J. Biol. Sci., 22: 289-302.
- TURNER, N. C. 1979. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In: Mussel, H. & Staples R. C. (eds.). Stress physiology in crop plants. Wiley-Interscience, New York. p.343-372.

- TURNER, N. C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. Plant Soil, 58: 339-366.
- TURNER, N. C. & BEGG, J. E. 1981. Plant-water relations and adaptation to stress. Plant Soil, 58: 97-131.
- VAN DILLEWIJN, C. 1952. Botany of sugar cane. The Chronica Botanica Co. Waltham, Mass., U. S. A. 371p.
- VASSILIEV, I. M. & VASSILIEV, M. G. 1936. Changes in carbohydrate content in wheat plant during the process of hardening for drought resistance. Plant Physiol., 11: 115-125.
- VATTUONE, M. A.; PRADO, F. E. & SAMPIETRO, A. R. 1981. Cell wall invertases from sugar cane. Phytochemistry, 20: 189-191.
- VIEIRA, I. M. S. 1983. Efeito do potássio sobre a atividade de invertases, teores de açúcares e compostos nitrogenados em cana-de-açúcar (Saccharum spp. var. NA 56-79) cultivada em solução nutritiva. Tese de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba, SP. 97p.
- VIEIRA DA SILVA, J. B. 1970. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse dans le genre Gossypium. II - La variation de quelques activités enzymatiques. Physiol. Vegetale, 8: 413-447.

- VIEIRA DA SILVA, J. B. 1976. Water stress, ultrastructure and enzymatic activity. In: Lange, O. L. Kappen, L. & Schulze, E. D. (eds.). Water and plant life: Problems and modern approaches. Springer-Verlag. New York. p. 205-224.
- VIQUEIRA, L.; GOMEZ, L. & RODRIGUEZ, C. 1983. Effect of water deficiency on two sugarcane varieties. In: 18th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings. p. 539-565.
- WALLACE, W. & PATE, J. S. 1965. Nitrate reductase in field pea (Pisum arvenis L.). Ann. Bot., 29: 665-671.
- WARDLAW, I. F. 1967. The effect of water stress on translocation in relation to photosynthesis and growth. I. Effect during grain development in wheat. Aust. J. Biol. Sci., 20: 25-39.
- WESTGATE, M. E. & BOYER, J. S. 1984. Transpiration- and Growth- induced water potentials in maize. Plant Physiol., 74: 882-889.
- WIEB, H. H. & WIHRHEIM, S. E. 1962. The influence of internal moisture deficit on translocation. Plant Physiol., 37: 1-11.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. 1955. The determination of amino acid with ninhydrin. Analyst, 80: 209-213.

YEMM, E. W. & WILLIS, A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 508-514.

ZUR, B.; BOOTE, K. J. & JONES, J. W. 1981. Changes in internal water relations and osmotic properties of leaves in maturing soybean plants. J. Exp. Bot., 32: 1181-1191.