

Recebido em 18 de Janeiro de 1990

Acção do H_2S sobre alguns parâmetros fisiológicos de plântulas de milho (*Zea mays* L.)

por

SARA AMÂNCIO

Professora Auxiliar, Departamento de Botânica
Instituto Superior de Agronomia

RESUMO

Plântulas de milho submetidas a atmosferas enriquecidas com H_2S foram estudadas com o objectivo de identificar os parâmetros fisiológicos mais sensíveis a este gás e comparar o comportamento desta espécie com o de outras previamente estudadas nas mesmas condições. Trabalhos anteriores com espinafre e outras plantas mostraram uma redução no crescimento, uma acumulação dos compostos tiólicos e do sulfato, alterações da actividade *in vivo* da nitrato redutase e da capacidade dos extractos dos tecidos vegetais em oxidar o NADH.

No presente trabalho os aspectos fisiológicos estudados foram os seguintes: actividade *in vivo* da nitrato redutase das folhas; capacidade dos extractos preparados a partir de tecidos foliares em oxidar o NADH; taxa de crescimento da parte aérea; acumulação de compostos tiólicos solúveis, nomeadamente a glutathione; conteúdos em sulfato e outros aniões; actividade das peroxidases e taxa transpiratória.

Os resultados obtidos mostram que as plantas de milho são muito mais tolerantes à presença de H_2S do que outras espécies estudadas.

SYNOPSIS

Maize seedlings submitted to environments enriched in H_2S were studied in order to identify the physiological parameters most sensitive to this gas and to compare this species with others already studied in the same conditions. Former work with spinach and other plants had shown a reduction in growth, an accumulation of thio compounds and of sulfate, changes of *in vivo* nitrate reductase activity and of the capacity of the plant extracts in oxidising NADH.

In this work, the physiological aspects studied were: *in vivo* nitrate reductase activity of the leaves; capacity of the extracts prepared from leaf tissues to oxidise NADH; growth rate of the shoot; accumulation of soluble thio compounds, namely glutathione; contents in sulfate and other anions; peroxidase activity and transpiratory rate.

The results obtained show that maize plants are much more tolerant to the presence of H_2S than other plant species studied.

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS PLANTAS SUPERIORES NO CICLO DO ENXOFRE

Cerca de 10^8 toneladas de enxofre circulam anualmente na atmosfera, cerca de 50% sendo de origem biológica. Esta quantidade é proveniente da redução de sulfatos e de enxofre orgânico (POSTGATE, 1984). Tanto as plantas como certas bactérias são capazes de reduzir o enxofre do nível de oxidação característico do sulfatão (+6) para o nível do sulfureto (-2) (ANDERSON, 1980). No entanto essa redução é assimilatória, com incorporação do enxofre reduzido em compostos orgânicos. Outra via de redução do sulfatão, realizada por bactérias dos géneros *Desulfovibrio* e *Desulfobacter*, consiste na metabolização anaeróbia do sulfato, reduzindo-o de forma desassimilatória (POSTGATE, 1984).

As plantas utilizam principalmente os sulfatos do solo como fonte de enxofre, segundo um mecanismo que não está bem esclarecido mas que é, provavelmente, dependente de um processo activo (MENGEL and KIRBY, 1982). No entanto, verificou-se que as plantas também são capazes de absorver, por via foliar, compostos de enxofre mais reduzidos que SO_4 tais como o SO_2 , o H_2S e os vapores de enxofre, provenientes quer de fenómenos naturais (erupções vulcânicas, aerossóis emitidos por mares e rios, emissões resultantes do metabolismo microbiano), quer de combustões provocadas pelo Homem e causadoras de poluição atmosférica. A absorção foliar de compostos de enxofre faz-se através dos estomas e não está sujeita a nenhum sistema de regulação. Como consequência, em zonas onde a poluição atmosférica é muito intensa, pode ocorrer uma acumulação de compostos de enxofre nas plantas, nomeadamente sulfato, cisteína e glutatona (MAAS, 1987b).

1.2. O H_2S COMO POLUENTE ATMOSFÉRICO

Os níveis atmosféricos de H_2S em zonas não poluídas são extremamente baixos (entre 0,1 e 0,2 ppb), sendo de referir que a semi-vida deste composto na atmosfera é de 8 a 12 horas, sendo facilmente oxidado a SO_2 (BEAUCHAMP *et al.*, 1984). Em zonas de intensa actividade industrial ou com poluição provocada por outras origens, a quantidade de H_2S atmosférico pode atingir níveis superiores a 100 ppb. Relativamente a Portugal, embora haja dados disponíveis sobre os valores atmosféricos de SO_2 , desconhecem-se quaisquer resultados sobre o H_2S (ROCHA, 1981).

As plantas que crescem em zonas com níveis atmosféricos elevados de compostos de enxofre apresentam, normalmente, sintomas de toxicidade que se podem reflectir numa redução do crescimento e da produção ou em outras sintomatologias relacionadas com a sua fisiologia (DE KOK *et al.*, 1983; MAAS *et al.*, 1985, 1987a). A capacidade de absorção e os mecanismos de desintoxicação que possam apresentar contribuem para a manifestação de tolerância que as plantas venham a manifestar, sendo certo que os factores ambientais têm uma importância decisiva nessa manifestação. Por tal razão, o estudo da tolerância de cada espécie ou cultivar à poluição por compostos atmosféricos de enxofre terá de ser realizado em condições que permitam controlar todos os factores a que as plantas fiquem submetidas.

1.3. OBJECTIVOS DO ESTUDO REALIZADO

O estudo que realizámos, submetendo plantas jovens de milho a atmosferas controladas e enriquecidas com diferentes concentrações de H_2S , teve por objectivo a identificação dos parâmetros fisiológicos mais sensíveis na referida espécie, assim como a comparação com outra espécie estudada nas mesmas condições e cujas características metabólicas e sistemáticas são significativamente distintas das do milho por se tratar de uma Dicotiledónea com mecanismo de fixação do CO_2 de tipo C_3 , o espinafre. Estudos anteriores demonstram que o espinafre (e outras espécies), quando submetidas a atmosferas com concentrações de 0,1 ppm (ou superiores) de H_2S durante períodos relativamente curtos, apresentam uma acentuada redução do seu crescimento (MAAS *et al.*, 1985, 1987a); uma significativa acumulação de compostos tiólicos, particularmente de glutathione e de sulfato (DE KOK *et al.*, 1985); alterações na actividade *in vivo* da enzima nitrato redutase (DE KOK *et al.*, 1986) e na capacidade dos seus extractos em oxidar o NADH (MAAS and DE KOK, 1988).

No trabalho experimental do presente estudo começaram por ser abordados os seguintes aspectos: actividade *in vivo* da nitrato redutase, em folhas; capacidade dos extractos foliares em oxidar o NADH; taxa de crescimento da parte aérea. Como no decorrer do trabalho se verificou que os resultados obtidos com o milho eram significativamente diferentes das respostas obtidas com espinafre, apontando para uma maior tolerância do primeiro, foram analisados outros parâmetros, nomeadamente: a acumulação de compostos tiólicos solúveis (particularmente a glutathione), os teores de sulfatos e de outros aniões, a actividade *in vitro* das peroxidases, e a taxa transpiratória.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A) CRESCIMENTO DAS PLANTAS

O material utilizado foi o milho híbrido CM105 $\times$ MBS501 fornecido pela Zea Select (Groningen, Holanda). Em todos os ensaios, à excepção das medições da taxa transpiratória e de algumas determinações de taxas de crescimento, em que foi usada toda a parte aérea, trabalhou-se com a segunda folha em fase estacionária de crescimento de plantas com 15 dias.

As sementes foram plantadas em vasos com vermiculite e germinadas em água, a 27°C. Após a emergência do coleóptilo e o desbaste das plantas de modo a deixar apenas três por vaso, estes foram mantidos em condições controladas de temperatura (25°C–22°C), humidade relativa (65%), e iluminação (270 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12-12). Durante o período de crescimento forneceu-se solução nutritiva 1/4 Hoagland por três vezes; nos intervalos os vasos foram regados com água sempre que necessário.

B) FUMIGAÇÃO

Para cada ensaio as plantas foram expostas a diferentes concentrações (0,25, 0,4 ou 1,0 ppm) de H_2S ou a ar normal em câmaras cilíndricas de 0,2 m³ (0,65 cm de diâmetro) em aço inoxidável e com cobertura em "plexiglass", sendo a iluminação fornecida através do topo por uma lâmpada Philips HPI-T de 400 W com uma intensidade de 170 ("normal") ou 35 ("baixa") $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12 horas (Fig. 1). O H_2S diluído em azoto foi misturado com o ar até à concentração desejada por meio de um controlador electrónico de fluxo ASM (Bilthoven). O fluxo do ar era de 0,05 m³ min⁻¹ e a atmosfera interior estava continuamente em circulação por acção de uma ventoinha. A temperatura do interior da câmara era de 22°C controlada pelo ajustamento da temperatura das suas paredes. Para os ensaios com intensidade luminosa "baixa" as plantas foram previamente "aclimatadas" a essa intensidade luminosa durante 8 h. Para cada ensaio foi estabelecido um lote testemunha mantido em condições idênticas ao do fumigado mas submetido a uma atmosfera de ar normal.

FIGURA 1

Câmara de fumigação onde foram colocados os vasos com as plantas submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de H_2S . (Fotografia de F. MAAS).



C) TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

As amostras utilizadas para os ensaios *in vivo* e *in vitro* eram constituídas por quadrados de cerca de 0,5 cm de lado, cortados a partir do terço médio da 2ª folha, excluída a nervura central, de 27 plantas "fumigadas" e de igual número de testemunhas. Para cada ensaio foram preparadas um mínimo de três amostras com pesos entre 0,2 e 0,1 g, analisadas em 2 ou 3 repetições.

C₁) ACTIVIDADE AERÓBIA *in vivo* DA NITRATO REDUTASE

Após infiltração por vácuo, durante 2 minutos, do meio de incubação constituído por 5 ml de tampão fosfato 1 M, pH 7,5, nitrato de potássio 0,1 M, 2,5% n-propanol, o material vegetal foi incubado em tubos de vidro, com uma vareta alargada em disco na extremidade imersa mantendo o material vegetal mergulhado no meio, a 30°C, durante uma hora, após o que se procedeu imediatamente à quantificação colorimétrica do nitrito formado (1 ml de meio de incubação, 1 ml de sulfanilamida a 1% em HCl 1,5 N, 1 ml naftiletilenodiamina, HCl a 0,01%). Depois de desenvolvida, a cor foi lida a 540 nm num colorímetro Vitatron e a conversão em nitrito feita a partir da correspondente curva de calibração. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$.

C₂) ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS *in vitro*

As amostras, após congelamento em azoto líquido, foram reduzidas a pó num almofariz e os respectivos extractos preparados com tampão e os adjuvantes apropriados para cada tipo de actividade a medir. Após filtração e centrifugação os extractos foram imediatamente analisados. Todas as operações foram realizadas a 4°C.

Para a determinação da actividade das peroxidases homogeneizou-se o material em 5 ml de tampão fosfato 13 mM, pH 7,5 e, após filtração, centrifugou-se a $20000 \times g$ durante 20 min. A actividade foi medida por leitura, a 470 nm, da absorvância correspondente à peroxidação do guaiacol, a 30°C, num espectrofotómetro Beckman 34 de duplo feixe. O meio de reacção era constituído pelo tampão de homogeneização, guaiacol 6,6 mM, H_2O_2 6,6 mM e uma amostra de 0,2 ml de extracto num volume final de 3 ml. A reacção foi sempre iniciada pela adição do H_2O_2 e lida contra um "branco" em que o H_2O_2 foi substituído por H_2O . Os resultados foram expressos em variação da absorvância a 470 nm $\text{g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$. Para medir o efeito directo do H_2S sobre a actividade do extracto fez-se borbulhar o gás concentrado (1470 ppm ou $2,06 \mu\text{g ml}^{-1}$), com um fluxo de 50 ml min^{-1} , durante o tempo necessário para que fossem atingidas as concentrações desejadas no volume de extracto utilizado.

Quando se pretendeu medir a capacidade dos extractos em oxidar o NADH, desintegrou-se 1 g de material vegetal em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, num volume total de 10 ml e, depois de filtrado, o extracto foi centrifugado a $30000 \times g$, durante 15 min. O meio de reacção era constituído pelo tampão de extracção, 0,2 ml de extracto e NADH na concentração final de 0,1 mM num volume de 2 ml; a reacção foi iniciada pela adição do NADH e lida contra uma referência sem NADH, a 340 nm. Como inibidores usou-se a superoxidodismutase (SOD) (200U), o cianeto de potássio (1 mM) ou ambos. Os resultados foram expressos em $\mu\text{moles NADH oxidado g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$.

C₃) TEOR EM COMPOSTOS TIÓLICOS SOLÚVEIS (GLUTATIONA)

O material vegetal (0,5 g) foi desintegrado com um Ultra-Turrax em 5 ml de uma solução de ascorbato de sódio a 0,3% na qual se fez borbulhar azoto. Após filtração o extracto foi desproteinizado por imersão num banho a 100°C, durante 3 min., após o que foi centrifugado a $30000 \times g$ durante 15 min. A determinação dos grupos -SH livres na fracção não proteica foi feita através da reacção de Ellman que usa como reagente específico o 5-5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB ou reagente de Ellman) 10 mM em tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 7,0. A mistura de reacção era constituída por 1,5 ml de Tris 0,2 M, pH 8,0, 0,5 ml de extracto e 0,1 ml de DTNB e a absorvância lida a 415 nm. Foi feita uma correcção para a absorvância do extracto (com o DTNB substituído por água) e para a do DTNB (com a amostra substituída pelo ascorbato de sódio). Os resultados, determinados a partir da absorvância molar do grupo -SH de 13 600, foram expressos em $\mu\text{moles -SH g}^{-1} \text{ PF}$. A adição de glutatona reduzida como padrão interno permitiu verificar que o rendimento da reacção é de cerca de 60%. O método que utiliza como meio de extração e de desproteinização o ácido sulfosalicílico não pôde ser aplicado na preparação de extractos de folhas de milho devido ao aparecimento, na mistura da reacção de Ellman e nos brancos, de uma coloração intensa, com máximo de absorção a 310 nm, que interferia com a leitura da reacção. Com outras espécies este método é de aplicação corrente com a vantagem de, evitando a fervura, permitir um rendimento da reacção da ordem de 90%.

C₄) CONCENTRAÇÃO ANIÓNICA

Os extractos foram preparados por homogeneização de 0,5 g de material foliar em 5 ml de água bidestilada, com Ultra Turrax, desproteinizados por incubação a 100°C durante 3 min e centrifugados a 30000×g 15 min. O sobrenadante foi conservado a -20°C até ser analisado por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) segundo o método descrito por MAAS *et al.*, 1986. O sistema usado era composto por uma bomba (Kipp Analytica mod 9208), um injector Rheodyne mod 7125 com um "loop" de 20 µl, uma coluna de troca aniónica de amónia quaternária (250× 4,6 mm) com pré-coluna (75× 2,1 mm), um detector por refractometria diferencial com um LED de 950 nm (Knauer mod 98.00) e um processador de dados (Chromatopac C-R1B, Shimadzu Corp.). A coluna e o detector foram mantidos a 26°C por meio de um banho com circulação. A fase móvel era constituída por uma solução de biftalato de sódio 0,03 M, pH 4,1, filtrada através de um filtro de fibra de vidro com poro de 1,6 µm (Whatman) e desgaseificada por vácuo. O sistema foi previamente calibrado com uma solução 5 mM de KH_2PO_4 , $3H_2O$, NaCl, KNO_3 e Na_2SO_4 (Fig. 2) e programado de modo a quantificar os mesmos aniões presentes nas amostras, em nM. Estas foram sempre injectadas em fracções de 20 µl. Os resultados foram expressos em µmoles g⁻¹ PF.

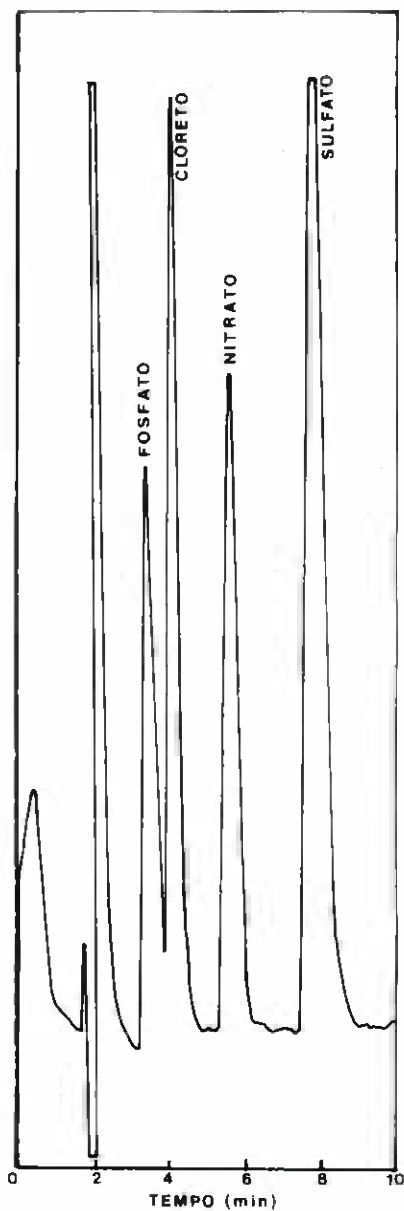
C₅) TAXA TRANSPIRATÓRIA

Após pesagem os vasos foram completamente cobertos com folha de alumínio. No termo do período definido (4 h) foram novamente pesados assim como o material vegetal. Assumiu-se que a diferença de peso verificada correspondeu ao vapor de água transpirado pelas plantas. Os resultados foram expressos em mg H_2O g⁻¹ PF h⁻¹.

C₅) TAXA DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento foi determinada por variação do peso fresco e do peso seco, sendo este valor obtido após manutenção do material a 80°C durante o tempo necessário para obter pesagens constantes. Os valores do peso fresco foram expressos em g e os do peso seco em mg g⁻¹ PF.

FIGURA 2 – *Cromatograma de uma solução 5 mM de KH_2PO_4 , NaCl , KNO_3 e Na_2SO_4 separada por HPLC e com detecção aniónica por refractometria.*



3. RESULTADOS

As plantas estudadas em intensidade luminosa “baixa” apresentaram, para cada tratamento, valores da actividade *in vivo* da nitrato redutase ligeiramente superiores aos das testemunhas, embora sem nunca ultrapassar os 10% de aumento. Aliás, a menor diferença (4%) verificou-se no tratamento mais prolongado (96 h), na presença de 1,0 ppm de H_2S . Para condições de iluminação “normal” os valores da actividade da enzima foram mais elevados do que em luz “baixa”, tanto nas testemunhas como nas plantas tratadas, mas estas apresentaram um decréscimo de cerca de 17% relativamente às testemunhas (Fig. 3).

Os teores dos compostos -SH solúveis são praticamente o dobro nas testemunhas em luz “baixa” do que nas que cresceram em luz “normal”. Todos os tratamentos de fumigação provocaram o aumento desses teores tendo-se o efeito acentuado com o tempo de tratamento e com a intensidade luminosa: em luz “baixa”, 48 h e 96 h de adição de H_2S conduziram a acréscimos de 1,5 e 2,5 vezes, respectivamente, enquanto com luz “normal” as plantas tratadas possuíam cerca de 4,5 vezes os teores das testemunhas (Fig. 4).

A actividade peroxidásica dos extractos foliares das plantas testemunhas e das que foram fumigadas com H_2S apresentou valores relativamente próximos, notando-se um ligeiro acréscimo de actividade nunca superior a 10%, quando a concentração do gás aumenta (Fig. 5). Quando se borbulha o gás directamente nos extractos observa-se, como se pode verificar pelas curvas da Fig. 6, um acentuado efeito inibidor da actividade enzimática, tanto nos extractos provenientes de plantas testemunhas como nos extractos das plantas tratadas.

A capacidade de oxidação do NADH pelos extractos preparados como foi descrito, foi idêntica nas testemunhas e nas plantas fumigadas. A SOD não teve qualquer efeito sobre a capacidade oxidativa dos extractos enquanto o cianeto a anulou totalmente (Tab. 1).

FIGURA 3 – Actividade *in vivo* de folhas de plântulas de milho em luz “baixa” e em luz “normal” submetidas a diferentes concentrações de H_2S durante períodos de 48 e 96 horas. Os valores são a média de três repetições analisadas em duplicado $\pm DP$.

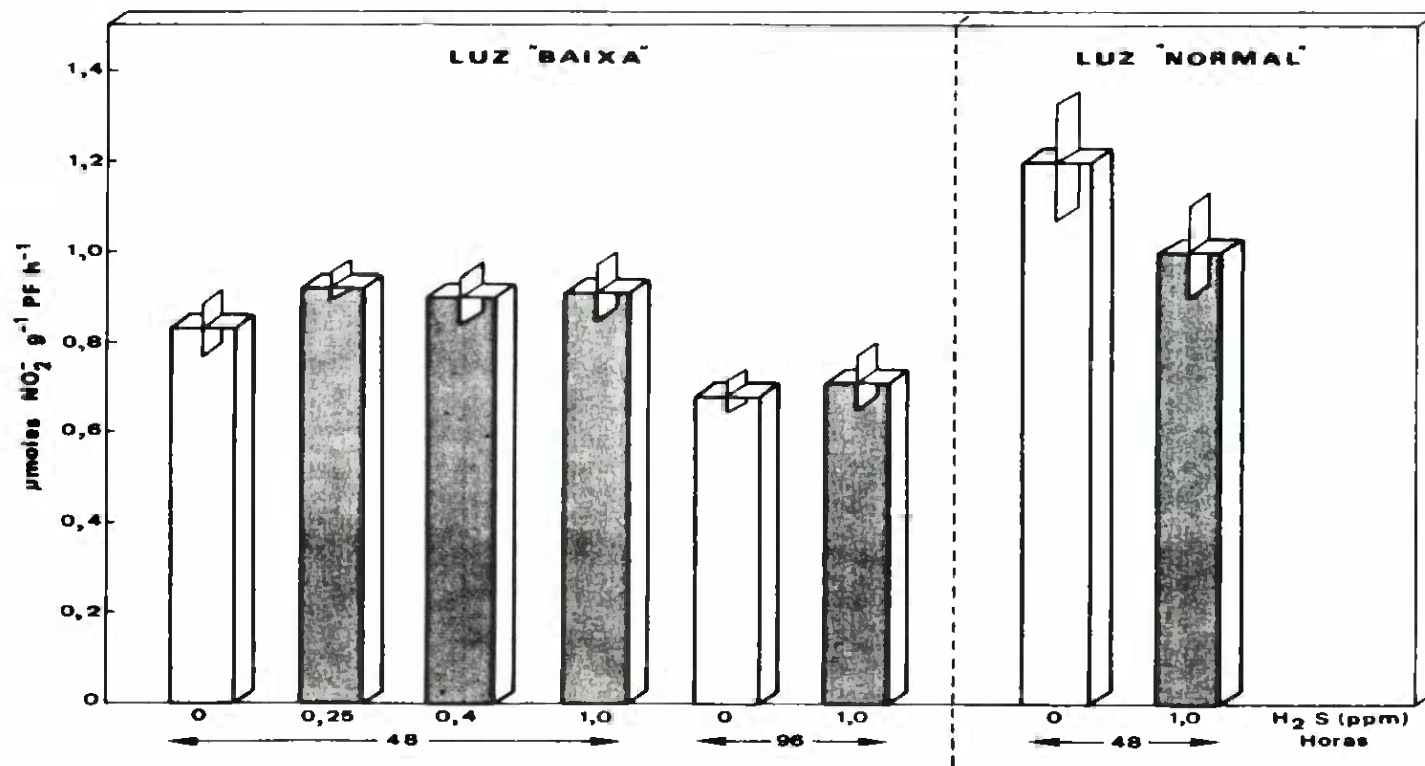


FIGURA 4 - Teores de compostos tiólicos solúveis de folhas de plântulas de milho em luz "baixa" e luz "normal" e submetidas a 1,0 ppm de H_2S durante períodos de 48 e 96 horas. Os valores são a média de três extractos analisados em duplicado $\pm DP$.

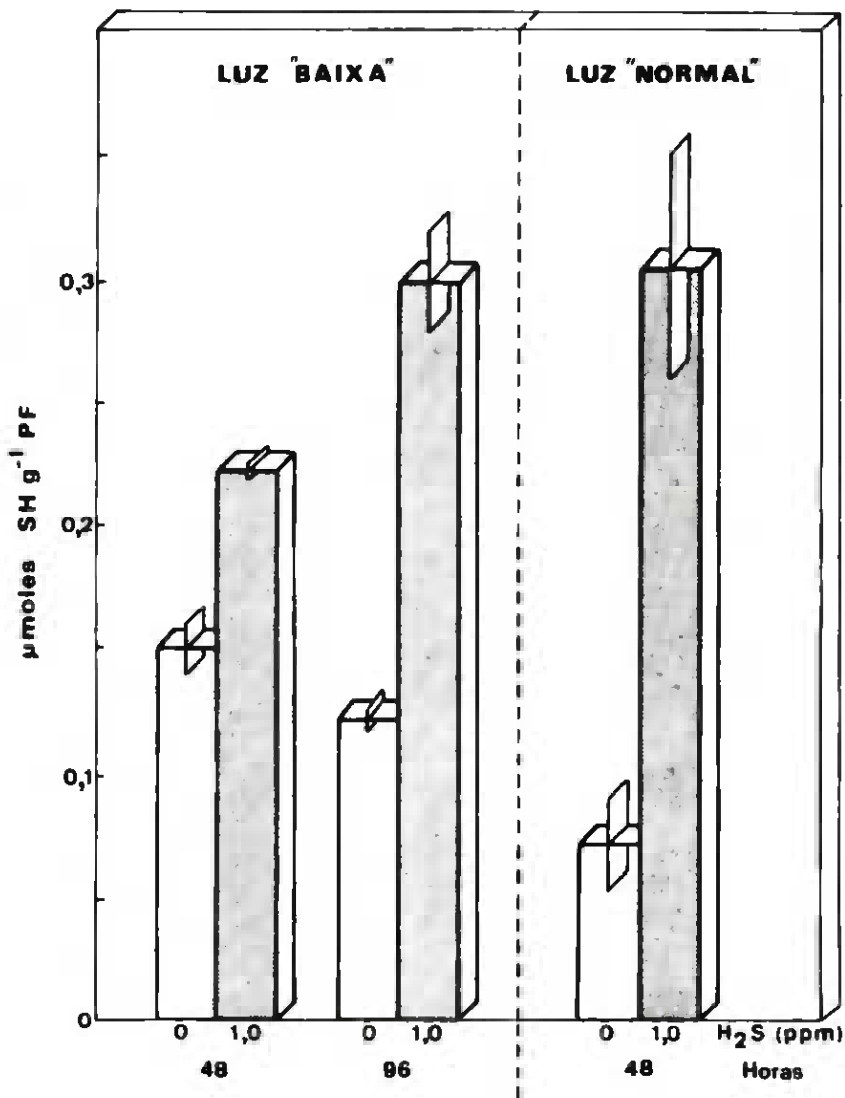


FIGURA 5 – *Actividade peroxidásica de extractos foliares de plântulas de milho submetidas a diferentes concentrações de H_2S durante 48 horas. Os valores são a média de três extractos analisados em duplicado $\pm DP$.*

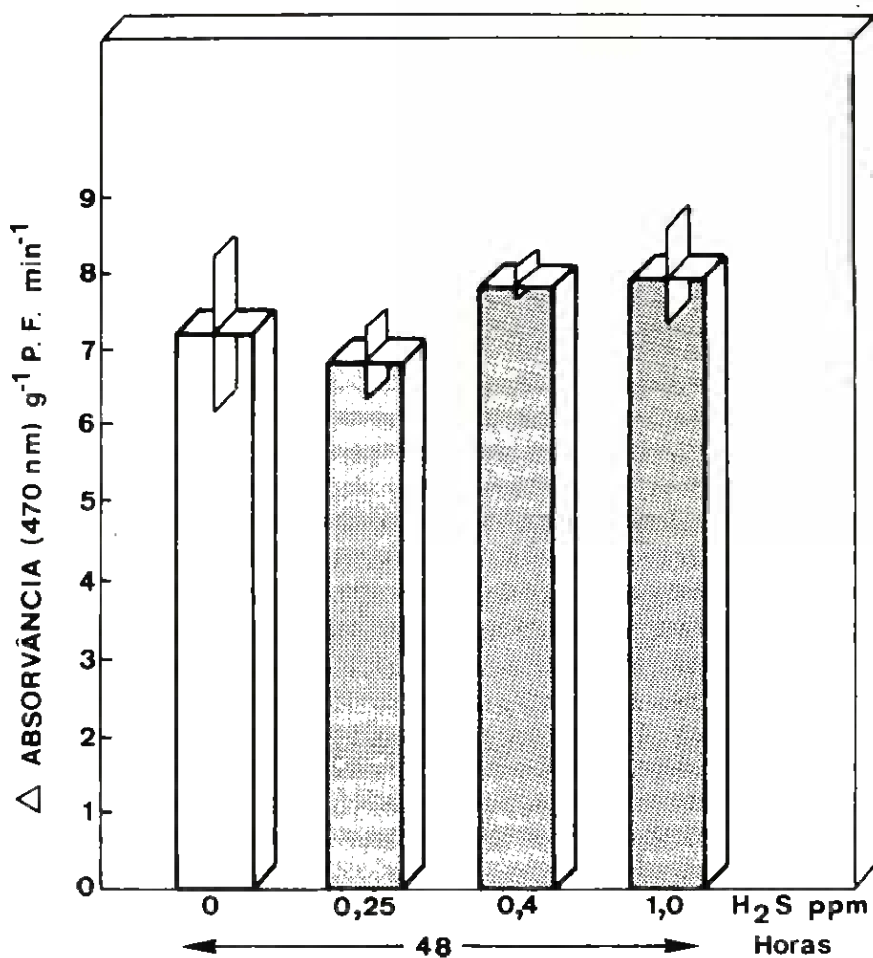


FIGURA 6 - Inibição da actividade peroxidásica de extractos foliares de plântulas testemunhas (T) e de plântulas fumigadas com 1,0 ppm de H_2S durante 48 horas (F), em consequência de concentrações crescentes do gás borbulhado directamente nos extractos.

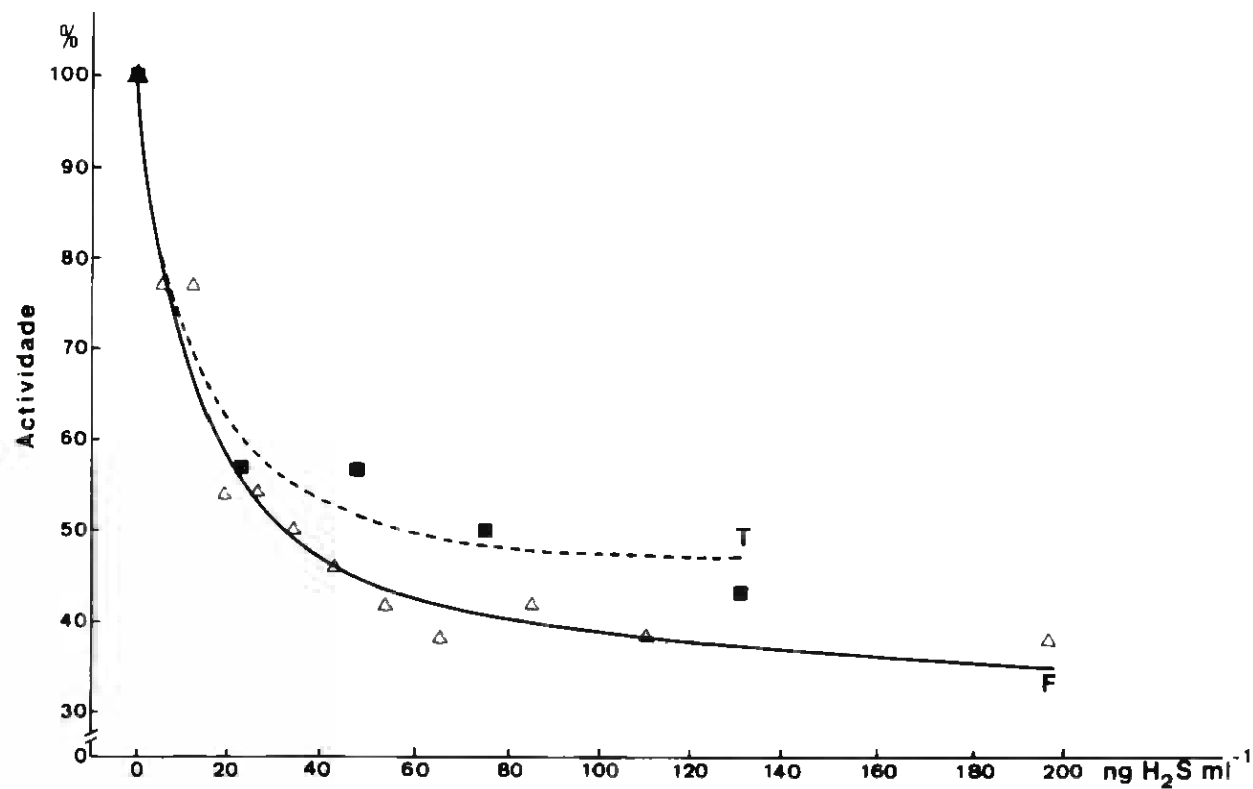


TABELA 1

Efeito de 48 h de tratamento de plântulas de milho com 1 ppm de H_2S sobre a capacidade de extractos da 2ª folha em oxidar o NADH.

A oxidação do NADH foi medida na presença e na ausência de superóxido dismutase (SOD) e de KNC.

H_2S (ppm)	Capacidade de oxidação do NADH ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ PF h}^{-1}$)		
		+SOD	+KCN
0	9,6	9,6	0
1	9,6	9,6	0

Em condições de luz "baixa", a acumulação de aniões nas plantas tratadas com 0,25 ppm de H_2S durante 48 h manifestou um ligeiro acréscimo; o aumento da concentração do gás conduziu a um decréscimo para níveis idênticos à testemunha (sulfatiação), ligeiramente inferiores (fosfatiação) ou de cerca de 50% (cloretiação e nitratiação). A aplicação de 1,0 ppm durante 96 h manteve o decréscimo do ião nitrato (33%) mas a acumulação do ião sulfato foi significativa (72%) (Fig. 7; Tab. 2). Em luz "normal" e após uma fumigação de 48 h com 1,0 ppm de H_2S , o resultado mais significativo foi não se ter detectado a presença do ião nitrato tanto nas testemunhas como nas plantas tratadas e um aumento de 28% no teor de sulfatiação (Fig. 8; Tab. 2).

A taxa transpiratória apresentou valores superiores em cerca de 50% nas plantas que cresceram em luz "normal", sem que se tivessem detectado diferenças significativas nas plantas fumigadas para ambos os níveis de intensidade luminosa (Tab. 3).

O crescimento da parte aérea acima da 2ª folha não foi significativamente alterado por nenhum dos tratamentos embora as plantas que cresceram em luz "baixa" tenham apresentado valores de peso fresco ligeiramente superiores (entre 10 e 15%) quando fumigadas com 1 ppm de H_2S (Tab. 4).

FIGURA 7 – Cromatogramas de extractos foliares de plântulas testemunhas (A) e de plântulas fumigadas com 1,0ppm de H_2S durante 96 horas (B), em condições de luz “baixa”, separados por HPLC e detectados por refractometria.

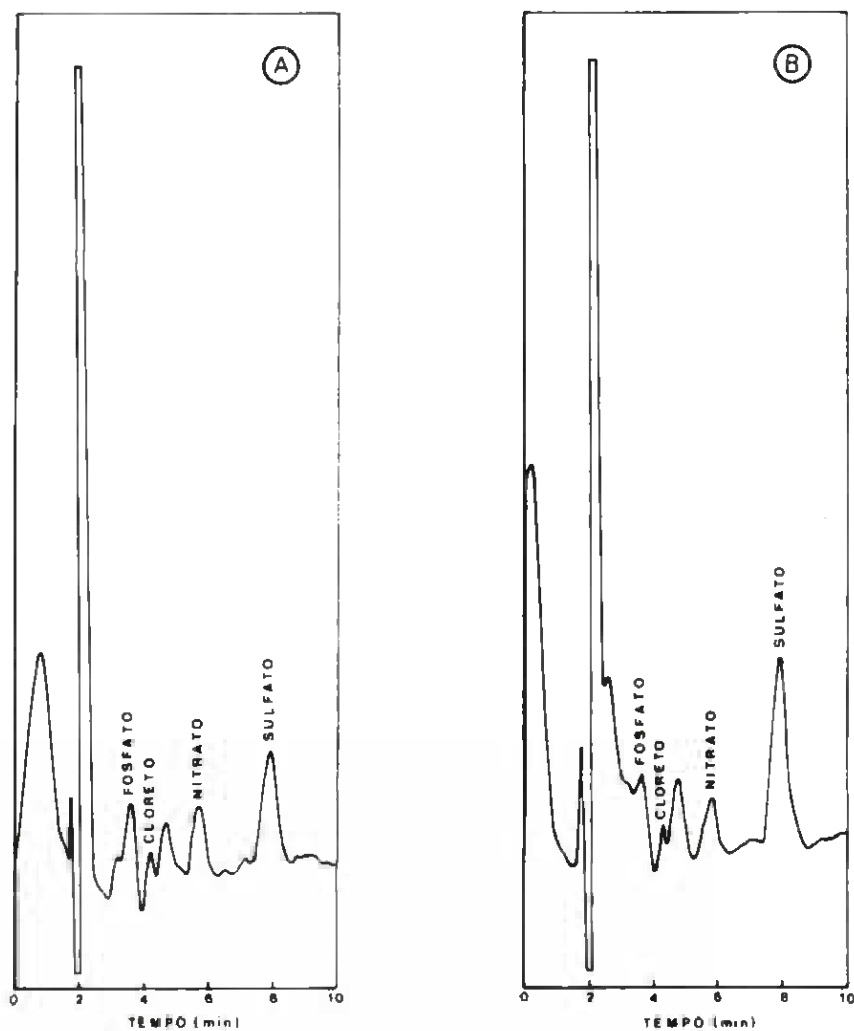


FIGURA 8 – Cromatogramas de extractos foliares de plântulas testemunhas (A) e de plântulas fumigadas com 1,0 ppm de H_2S durante 48 horas (B), em condições de luz “normal”, separados por HPLC e detectados por refratometria.

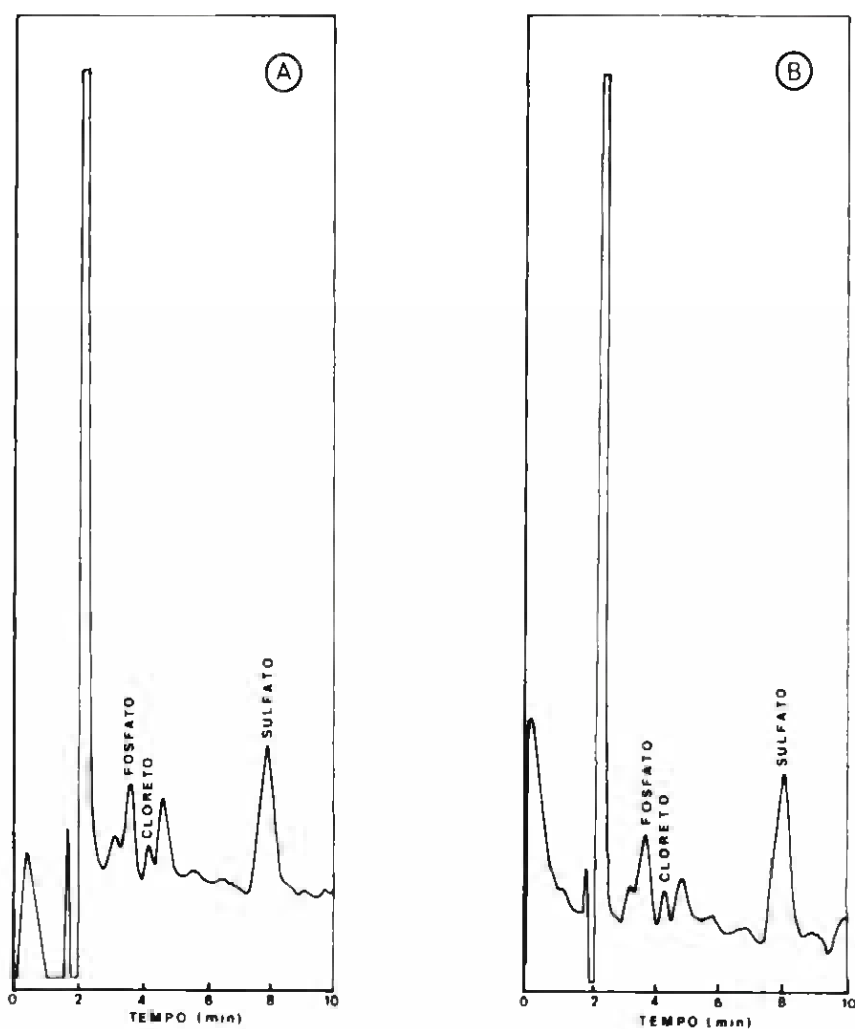


TABELA 2 - *Efeito de diferentes tratamentos com H₂S sobre o teor em aniões de extractos da 2ª folha de plântulas de milho. Cada valor representa a média de dois extrac-tos analisados em duplicado ± DP.*

H ₂ S (ppm)	TEMPO (h)	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻ (μmol g ⁻¹ PF)	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
LUZ "BAIXA"					
0	48	9,3±2,4	3,1±1,2	6,4±1,2	7,1±1,2
0,25	"	11,3±2,1	3,5±2,1	7,6±1,0	8,4±1,0
0,40	"	8,7±1,2	2,4±0,3	7,4±0,8	7,1±0,7
1,0	"	7,4±1,9	1,7±0,2	3,4±0,2	7,0±0,6
0	96	8,9±2,7	2,0±0,7	7,3±1,0	6,1±0,3
1,0	"	7,6±2,2	2,8±0,5	4,9±0,7	10,5±0,4
LUZ "NORMAL"					
0	48	10,4±1,4	2,0±0,4	0	7,6±1,2
1,0	"	8,6±1,2	2,4±1,0	0	9,7±0,2

TABELA 3 - *Taxa transpiratória de plântulas de milho na ausência e na presença de H₂S em dois regimes de iluminação. Os valores são a média de 9 plântulas envasadas ± DP.*

H ₂ S (ppm)	TAXA TRANSPIRATÓRIA (g H ₂ O g ⁻¹ PF h ⁻¹)	
	LUZ "BAIXA"	LUZ "NORMAL"
0	0,18±0,08	0,33±0,04
1,0	0,20±0,1	0,30±0,03

TABELA 4

Crescimento da parte aérea acima da 2ª folha e da 2ª folha de plântulas de milho submetidas a diferentes tratamentos com H₂S.
(n = nº de plântulas).

H ₂ S (ppm)	TEMPO (h)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (mg g ⁻¹ PF)	n
PARTE AÉREA ACIMA DA 2ª FOLHA				
LUZ "BAIXA"				
0	48	0,40±0,09	82±5	27
0,25	"	0,36±0,09	82±4	9
0,40	"	0,41±0,1	81±2	9
1,0	"	0,47±0,08	89±2	9
0	96	0,43±0,08	77±4	9
1,0	"	0,28±0,15	82±4	9
LUZ "NORMAL"				
0	48	0,29±0,06	93±5	9
1,0	"	0,23±0,07	93±4	9
2ª FOLHA				
0	48	0,50±0	109±12	3
1,0	"	0,50±0	113±12	3

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A actividade *in vivo* da nitrato redutase medida em aerobiose em folhas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.) aumenta até cerca de 5 vezes após 24 h de tratamento com 0,25 ppm de H₂S em luz "baixa" (35 µmol⁻² s⁻¹), (DE KOK *et al.*, 1986). Este resultado poderia derivar de um efeito inibitório do H₂S sobre enzimas oxidativas do NADH (MAAS and DE KOK, 1988) distintas das desidrogenases que

participam no processo respiratório, dado que a actividade respiratória de folhas de espinafre tratadas não é alterada (DE KOK *et al.*, 1986). Na 2ª folha de plântulas de milho submetidas a tratamentos com concentrações de H_2S equivalentes ou até superiores às acabadas de referir para as folhas de espinafre, a actividade *in vivo* da nitrato redutase apresentou aumentos negligíveis, nunca superiores a 10% (Fig. 3). Por outro lado, a capacidade dos extractos de folhas de plântulas de milho tratadas em oxidar o NADH foi idêntica à das testemunhas enquanto que no espinafre se verificou uma inibição de 40% (MAAS and DE KOK, 1988). Ao contrário do que foi descrito para extractos de folha de espinafre, a oxidação do NADH por extractos de milho revelou-se totalmente independente da SOD excluindo a presença de reacções mediadas por superóxidos. De referir ainda a total inibição das referidas reacções pelo KNC, resultado que também não se verificou com extractos de espinafre onde apenas 60% da capacidade em oxidar o NADH é inibida pelo cianeto.

A actividade das peroxidases é frequentemente utilizada como indicador de "stresses", o seu valor aumentado em situações de défice hídrico (AMÂNCIO, resultados não publicados), de poluição pelo SO_2 (PIERRE and QUEIROZ, 1962) ou de senescência (LEWINGTON *et al.*, 1967). No caso concreto do H_2S , o efeito inibitório poderia resultar da sua complexação com as enzimas, como foi verificado em raízes de plântulas de arroz (ALLAM and HOLLIS, 1972). Tal não se verificou nas folhas de milho onde a actividade peroxidásica aumentou ligeiramente (Fig. 5), tal como se observou em folhas de espinafre (MAAS and DE KOK, 1988) embora neste material o aumento da actividade da enzima seja acentuado traduzindo, provavelmente, um "stress" mais pronunciado. No entanto, quando o gás foi directamente borbulhado nos extractos foliares de milho observou-se uma marcada inibição da actividade peroxidásica embora mais acentuada nos extractos das plantas tratadas (Fig. 6). O "plateau" atingido deve traduzir o máximo da dissolução do gás no extracto mas o tipo de curva obtido põe em evidência o efeito inibidor do ácido sulfídrico sobre a cinética das peroxidases. A ausência de efeito pronunciado nos extractos das plantas de milho fumigadas poderia significar a existência de uma maior compartimentação do H_2S do que no espinafre.

A acumulação de compostos tiólicos, em particular ou exclusivamente glutatona, em resposta á fumigação com H_2S ficou bem demonstrada em espinafre (DE KOK *et al.*, 1985, 1986). A glutatona

poderia funcionar como uma forma de acumulação de enxofre reduzido mantendo a cisteína em níveis adequados à regulação do metabolismo do enxofre (RONNENBERG, 1984). Na 2ª folha de milho desenvolvido em luz "baixa", a presença de 1,0 ppm de H_2S durante 48 ou 96 h dá origem a um aumento de teor em compostos tiólicos de 1,5 e 2,5 vezes relativamente às respectivas testemunhas (Fig. 4). Este efeito está próximo do aumento de 3,5 vezes obtido por DE KOK *et al.* (1983) em espinafre nas mesmas condições de iluminação após um período de 15 dias de aplicação de 0,30 ppm. Com iluminação "normal" as folhas de diferentes variedades de *Spinacea oleracea* tratadas durante três semanas com 0,25 ppm de H_2S apresentaram teores de compostos tiólicos entre 2 e 8 vezes superiores aos das testemunhas (MAAS *et al.*, 1985). No milho, nas mesmas condições de iluminação, os teores medidos na testemunha são praticamente metade dos que se mediram na testemunha em luz "baixa", certamente devido à ausência do efeito provocado pela iluminação insuficiente; o efeito da fumigação foi particularmente acentuado conduzindo, ao fim de 48 h, a um resultado que é cerca de 4,5 vezes o da testemunha respectiva (Fig. 4).

Considerando ainda as condições de luz "normal" verifica-se que a acumulação de sulfatiação é, após 48 h de tratamento com 1,0 ppm de SH_2 , apenas superior em 28% à testemunha (Tab. 2, Fig. 8) enquanto em luz "baixa" esse aumento foi bastante mais acentuado (72%) o que pode significar que as condições de iluminação não são favoráveis à sua posterior redução. Note-se que a acumulação do sulfatiação é um fenómeno comum em situações de excesso de compostos com enxofre independentemente da sua forma, podendo os compostos mais reduzidos como o H_2S ser oxidados a sulfato ou inibir a redução deste ião que, consequentemente, se acumula (RONNENBERG, 1984).

A luz "baixa" com que se realizou a maior parte das experiências deste estudo, com o objectivo de manter as condições usadas para o espinafre e permitir a comparação dos resultados é, aparentemente, insuficiente para o milho, que possui um elevado ponto de compensação para a luz. Por exemplo, quando se usou luz "normal" o nitrato deixou de se acumular tanto nas testemunhas como nas plantas tratadas (Tab. 2, Fig. 8), resultado que se coaduna com valores mais elevados da actividade da nitrato redutase e que pode traduzir uma maior capacidade redutora. A acumulação de glutathione foi ainda, nas plantas fumigadas, a mais elevada, podendo

revelar um maior metabolismo do H_2S que se traduz por uma moderada acumulação de sulfato e que pode resultar da diminuição da sua absorção regulada pelo teor de compostos reduzidos de enxofre (RONNENBERG, 1984). De referir igualmente que a ausência de diferenças na taxa transpiratória das plantas tratadas relativamente às suas testemunhas e para ambas as condições de iluminação (Tab. 3), poderia mostrar que o gás não só não actua ao nível da resistência estomática como não provocou alterações significativas na absorção mineral.

No que diz respeito aos efeitos sobre o crescimento, tratamentos de 2 ou 3 semanas provocaram reduções de peso fresco até cerca de 60% em espinafre (MAAS *et al.*, 1985), de 27% em beterraba e de menos de 10% em milho (DE KOK *et al.*, 1983) sem contudo afectarem a sua matéria seca ou a aumentarem apenas muito ligeiramente. Os ensaios de curta duração realizados com milho não provocaram alterações significativas do crescimento das plântulas, os maiores valores de peso fresco observados nas plantas em luz "baixa" resultando certamente de um efeito de estiolamento já que não se traduzem num correspondente aumento de peso seco. De referir apenas acréscimos de peso fresco de 18% e 12% nos tratamentos com 1,0 ppm e durante 48 e 96 h, respectivamente, que não tiveram idêntica repercussão no peso seco que só aumentou cerca de 9% e 7%. O peso fresco das plântulas em luz "normal" passou para quase metade, revelando ausência de estiolamento, enquanto a matéria seca foi ligeiramente superior, não acusando qualquer efeito da fumigação.

Os resultados obtidos após um tratamento breve sobre plântulas de milho permitem concluir que esta espécie apresenta maior tolerância que outras, nomeadamente o espinafre, em particular quanto aos parâmetros do crescimento. De salientar que como o milho é uma planta de crescimento rápido, o número de folhas das plântulas usadas no presente estudo era pouco inferior ao de folhas de espinafre tratado durante 15 a 21 dias. A sua maior tolerância traduzida ainda na insensibilidade de outros processos fisiológicos não parece poder imputar-se às suas características de planta C_4 pois outras Monocotiledóneas C_3 manifestam o mesmo tipo de comportamento (STULEN, I., comunicação pessoal). Importa que estudos subsequentes possam vir a esclarecer quais são as características fisiológicas partilhadas por essas espécies que lhes conferem maior resistência ao H_2S .

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Biologia da Universidade de Gröningen (Haren, Holanda) integrado num projecto de investigação coordenado pela Dr^a I. Stulen, a quem exprimimos os nossos agradecimentos pelo bom acolhimento e acompanhamento durante o decorrer da parte experimental.

Agradecemos igualmente ao Prof. Artur Teixeira pela leitura crítica do manuscrito e ao Sr. Batista de Sousa pela elaboração das figuras.

O estágio que permitiu a concretização deste estudo que teve a duração de três meses, foi subsidiado pelo Instituto Superior de Agronomia.

BIBLIOGRAFIA

- ALLAM, A.I. and HOLLIS, J.P. (1972) — Sulfide inhibition in rice roots, *Phytopatology*, 62: 634-639.
- ANDERSON, J.W. (1980) — *Assimilation of inorganic sulfate into cysteine*. In "The Biochemistry of Plants", Vol. 5, Miflin, B.J., ed., Academic Press, P. 203-223.
- BEAUCHAMP JR, R.O., BUS, J.S., POPP, J.A., BOREIKO, C.J. and ANDJELKOVICH, D.A. (1984) — A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity, *C R C Critical Reviews in Toxicology*, 13: 25-97.
- DE KOK, L.J., THOMPSON, C.R., MUDD, J.B. and KATS, G. (1983) — Effect of H₂S fumigation on water-soluble sulphydryl compounds in shoots of crop plants, *Z. Pflanzenphysiol.*, 111: 85-89.
- DE KOK, L.J., BOSMA, W., MAAS, F.M. and KUIPER, P.J.C. (1985) — The effect of short-term H₂S fumigation on water-soluble sulphydryl and glutathione levels in spinach, *Plant Cell Environ.*, 8: 189-194.
- DE KOK, L.J., STULEN, I., BOSMA, W. and HIBMA, J. (1986) — The effect of short-term H₂S fumigation on nitrate reductase activity in spinach leaves, *Plant Cell Physiol.*, 29: 523-526.

- ELLMAN, G.L. (1959) — Tissue sulphhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- LEWINGTON, R.J., TALBOT, M. and SIMON E.W. (1967) — The yellowing of attached and detached cucumber cotyledons, *J. Exp. Bot.*, 18(56): 526-534.
- MAAS, F.M., DE KOK, L.J. and KUIPER, P.J.C. (1985) — The effect of H₂S fumigation on various spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivars. Relation between growth inhibition and accumulation of sulphur compounds in the plant, *J. Plant Physiol.*, 119: 219-226.
- MAAS, F.M., HOFFMANN, I., VAN HARLMELLEN, M.J. and DE KOK, L.J. (1986) — Refractometric determination of sulphate and other anions in plants separated by High-Performance Liquid Chromatography, *Plant and Soil*, 91: 129-132.
- MAAS, F.M., DE KOK, L.J., PETERS, J.L. and KUIPER, P.J.C. (1987 a) — A comparative study on the effects of H₂S and SO₂ fumigation on the growth and accumulation of sulphate and sulphhydryl compounds in *Trifolium pratense* L., *Glycine max* Merr. and *Phaseolus vulgaris* L., *J. Exp. Bot.*, 38: 1459-1469.
- MAAS, F. (1987 b) — *Responses of plants to sulfur containing air pollutants (H₂S and SO₂)*, Tese de doutoramento, Universidade de Gröningen, Holanda.
- MAAS, F.M. and DE KOK, L.J. (1988) — *In vitro* NADH oxidation as an early indicator for growth reduction in spinach exposed to H₂S in the ambient air, *Plant Cell Physiol.*, 29: 523-526.
- MENGEL, K. and KIRKBY, E.A. (1982) — *Principles of plant nutrition*, International Potash Inst.
- PIERRE, M. and QUEIROZ, O. (1982) — Modulation by leaf age and SO₂ concentration of the enzymic response to subnecrotic SO₂ pollution, *Environ. Poll.*, 28: 209-217.
- POSTGATE, J.R. (1984) — *The sulfate-reducing bacteria*, Cambridge University Press.
- ROCHA, F. (1981) — *Poluição atmosférica e agricultura*, Ministério da Agricultura, Comércio e Pescas, Secretaria de Estado da Produção Agrícola, Direcção-Geral de Protecção da Produção Agrícola.
- RONNENBERG, H. (1984) — The fate of excess sulfur in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35: 121-153.

