

**MOEMY GOMES DE MORAES**

**EFEITOS DA ANOXIA NO TEOR DE PROTEÍNAS E NAS ATIVIDADES  
DA ÁLCOOL E LACTATO DESIDROGENASES EM ESPÉCIES  
HERBÁCEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1995**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Moraes, Moemy Gomes de

Efeitos da anoxia no teor de proteínas e nas atividades da álcool e lactato desidrogenases em espécies herbáceas / Moemy Gomes de Moraes. -- Lavras : UFLA, 1995.

42p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Planta herbácea - Anoxia. 2. Proteína. 3. Álcool desidrogenase. 4. Lactato desidrogenase. 5. Enzima. 6. Estresse ambiental. 7. Gramineae. 8. Fisiologia vegetal. 9. Bioquímica vegetal. I Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 581.133

- 581.192

- 582.12

**MOEMY GOMES DE MORAES**

**EFEITOS DA ANOXIA NO TEOR DE PROTEÍNAS E NAS ATIVIDADES  
DA ÁLCOOL E LACTATO DESIDROGENASES EM ESPÉCIES  
HERBÁCEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

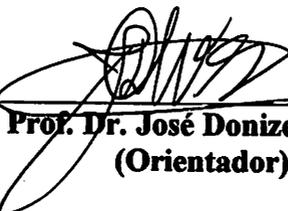
APROVADA em 31 de Agosto de 1995



Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira



Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos



Prof. Dr. José Donizeti Alves  
(Orientador)

**Este trabalho faz parte do projeto “Estudo integrado da vegetação ciliar do alto do Rio Grande e implantação de projeto de reflorestamento, com espécies nativas e exóticas na região, as margens dos reservatórios da CEMIG em Itutinga e Camargos, Minas Gerais”, que está sendo desenvolvido através do contrato CEMIG/UFLA/FAEPE.**

“Uma das mais profundas, das mais características funções dos organismos vivos, é a de olhar para frente, de produzir futuro... Não há um único movimento, uma única postura que não implique num desenvolvimento, uma passagem para o próximo momento. Respirar, comer, mover-se é realmente antecipar. Ver é prever. Com cada uma de nossas ações e cada um de nossos pensamentos, nos engajamos no que virá a ser. Um organismo vive em função da realidade de que continuará a VIVER... e AMAR”

**François Jacob**

**À minha família**

**Celeste, Valentino, Moema e Walter.**

**Dedico e ofereço**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de realização do curso e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG pelo financiamento parcial deste projeto.

Ao professor José Donizeti Alves, pela orientação, confiança e entusiasmo constante.

Aos professores Luiz Edson Mota de Oliveira e Custódio Donizete dos Santos pelas sugestões apresentadas.

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela permissão para utilização dos equipamentos e dependências do Laboratório de Cultura de Tecidos/DAG/UFLA.

À bolsista de Iniciação Científica Gláucia Angélica Amaral, pelo auxílio na condução do experimento e companheirismo.

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro da Universidade Federal de Viçosa e à Nelson Delú Filho, pelo grande auxílio nas análises eletroforéticas.

Aos funcionários Dartagnam, Izonel e Eustáquio, pelo auxílio prestado.

À todos os amigos, do curso de Pós-Graduação ou não, pelo incentivo, apoio e amizade.

À todos que contribuíram, de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Seleção do material vegetal.....	8
3.2 Análise do crescimento.....	10
3.3 Avaliação do vigor e da sobrevivência com o retorno às condições normais de aeração.....	11
3.4 Extração e quantificação da atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase.....	13
3.5 Quantificação do teor de proteínas solúveis.....	14
3.6 Avaliação do padrão eletroforético de proteínas .....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Efeito do déficit de oxigênio no crescimento relativo.....	16

4.2 Sobrevivência das plantas ao retorno para condições normais de aeração.....	20
4.3 Efeito do déficit de oxigênio no teor de proteínas.....	24
4.4 Efeito do déficit de oxigênio na atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase.....	28
4.5 Influência do déficit de oxigênio no padrão eletroforético de proteínas.....	33
5 CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Período máximo de sobrevivência das espécies submetidas à anoxia.....	12
2	Crescimento relativo das seis espécies estudadas em tratamento aerado (círculo cheio) e anóxico (círculo vazio). Média de três repetições.....	17
3	Sobrevivência das espécies após uma semana de retorno às condições normais de aeração.....	21
4	Teor de proteínas solúveis nas folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas sob tratamento aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições ± erro padrão da média .....	25
5	Atividade da enzima álcool desidrogenase em folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas submetidas ao tratamento aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições ± erro padrão da média.....	29
6	Atividade da enzima lactato desidrogenase em folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas submetidas ao tratamento aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições ± erro padrão da média.....	30
7	Varição no padrão eletroforético de proteínas de folhas em anoxia.....	35

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
1 Espécies que foram estudadas previamente em condições de alagamento.....	8
2 Vigor e presença de odores de fermentação ao final do período experimental nas seis espécies estudadas submetidas à anoxia.....	19

## RESUMO

MORAES, Moemy Gomes de. **Efeitos da anoxia no teor de proteínas e nas atividades da álcool e lactato desidrogenases em espécies herbáceas.** Lavras: UFLA, 1995. 42p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)\*.

Objetivou-se estudar o comportamento de *Polygonum acuminatum*, *Echinochloa polystachia*, *E. pyramidalis*, *Brachiaria mutica*, *Melinis minutiflora* e *Digitaria suazilandensis* frente ao estresse anaeróbico, avaliando-se o crescimento durante o déficit de oxigênio, a sobrevivência das plantas com o retorno às condições normais de aeração, associando-os à alterações na atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase e variações qualitativas e quantitativas das proteínas.

Foi observado um comportamento distinto no teor de proteínas tanto nas espécies estudadas quanto em seus órgãos. Nas seis espécies a álcool desidrogenase e a lactato desidrogenase são constitutivas nas folhas e nas raízes, havendo de maneira geral a redução ou a manutenção na atividade das enzimas com o decorrer do período experimental para os dois tratamentos e não ocorrendo diferenças expressivas nas raízes.

*P. acuminatum* foi a espécie que apresentou estratégias de tolerância mais eficientes, mantendo o metabolismo anaeróbico em níveis suficientes para o crescimento e sobrevivência pós-anaerobiose. *E. polystachia* teve decréscimo no teor de proteínas e na atividade das enzimas com a aplicação dos tratamentos, contudo manteve seu crescimento em magnitude semelhante para os

---

\* Orientador : Prof. Dr. José Donizeti Alves. Membros da Banca: Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira e Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos.

sobrevivência pós-anoxia. Em *B. mutica* houve um ajuste metabólico para as vias fermentativas, propiciando o sucesso dessa espécie durante o período em anoxia e sua sobrevivência pós-anoxia. *M. minutiflora* e *D. suazilandensis* tiveram o teor proteico e atividade das enzimas reduzida com a anoxia, sendo insuficientes para que ocorresse o crescimento e o restabelecimento dessas espécies em ambiente com condições normais de aeração. Houveram variações no padrão eletroforético de proteínas de *E. polystachia*, *E. pyramidalis*, *B. mutica*, e *D. suazilandensis* detectadas desde o primeiro dia de anoxia pelo desaparecimento de bandas e pelo surgimento e permanência de outras bandas, confirmando a influência do estresse anaeróbico no metabolismo respiratório das espécies estudadas.

## **SUMMARY**

### **EFFECTS OF THE ANOXIA ON PROTEIN LEVELS AND ON ACTIVITIES OF ALCOHOL AND LACTATE DEHYDROGENASES IN HERBACEOUS SPECIES.**

The objective of this experiment was study the behavior of *Polygonum acuminatum*, *Echinochloa polystachia*, *E. pyramidalis*, *Brachiaria mutica*, *Melinis minutiflora* and *Digitaria suazilandensis*, in anaerobic stress, observing the growth during the oxygen deficit, plants survival with the return to normal aeration conditions, associating both to changes of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase activity and qualitatives and quantitatives changes of proteins.

A different behavior was observed in protein levels in species and your organs. In this six species the alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase was constitutives in the leaves and roots, with a reduction or the maintenance in enzymatic activity during the experimental period for both treatments, occurring no expressive differences in roots, in generally way.

The specie that presented more efficient strategies was *P. acuminatum*, maintainning the anaerobic metabolism in sufficient levels to growth and pos-anaerobiosis survival. *E. polystachia* had a degree in protein level and enzymatic activity with treatment aplication,

therefore this specie keep your growth in equivalent level for both treatments, using your reserves with negative reflexus in vigour and post-anoxic survival .

There was a metabolic adjust in *B. mutica* for fermentative pathways, possibilitig the sucess of this specie during the anoxic period and your post-anoxic survival. *M. minutiflora* and *D. suazilandensis* had a reduced proteic level and enzymatic activity in anoxia, and it was no sufficient to the growth and the reestablishment of these species in normal conditions of aeration environment. There were changes in protein eletrophoretic pattern of *E. polystachia*, *E. pyramidalis*, *B. mutica* and *D. suazilandensis*, observed since the first anoxic day by the bands disappearance and by the emerging and keep of other ones, confirming the inffluence of anaerobic stress on respiratory metabolism of the studied species.

## 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 6% da superfície terrestre do globo são ocupadas por áreas alagadas ou sujeitas ao alagamento temporário (Maltby, 1991). Irrigação em solos mal drenados, alto regime pluvial, subsolo compactado, assoreamento dos rios e elevação do nível de água de represas e reservatórios hidrelétricos, são as causas mais freqüentemente apontadas como responsáveis por esta condição.

Particularmente no Estado de Minas Gerais, somente as margens de depleção das represas hidrelétricas da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) estende-se por um perímetro próximo ao da Costa Brasileira e a variação do deplecionamento em algumas represas chega a atingir 30,0 m (N. J. S. do Prado, comunicação pessoal). Esta área marginal das represas, fica encoberta por água durante quatro meses por ano em média, deixando as plantas parcialmente e em alguns casos, completamente alagadas.

Em ambientes como este, onde a resistência difusiva da maioria dos gases é aproximadamente 10.000 vezes maior que no ar, a concentração de oxigênio atinge, facilmente, o nível de hipoxia ou de anoxia (Armstrong, Brändle e Jackson, 1994) culminando com o desaparecimento da vegetação ciliar, o que contribui efetivamente para o assoreamento, turbidez das águas, desequilíbrio do regime de cheias, erosão e perda da perenidade dos rios, lagoas e reservatórios, além do empobrecimento da ictiofauna.

Dentre as causas do insucesso do desenvolvimento de plantas em ambientes alagados, onde ocorre a baixa disponibilidade de oxigênio, destaca-se a sensibilidade das espécies a este tipo de estresse como decorrência da ausência de mecanismos de tolerância ou resistência.

As diferentes estratégias de tolerância de diversas espécies ao estresse anóxico vem sendo estudadas dentro do convênio CEMIG/UFLA/FAEPE. Esses estudos têm sido conduzidos em condições de casa de vegetação, com o alagamento do sistema radicular das plantas, e em condições de campo, nas áreas de depleção de reservatórios hidrelétricos, com o alagamento total ou parcial das plantas.

Objetivou-se portanto, estudar o comportamento de espécies herbáceas frente ao estresse anóxico, avaliando-se o crescimento durante o déficit de oxigênio, a sobrevivência das plantas com o retorno às condições normais de aeração, associando-os à alterações na atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase e variações qualitativas e quantitativas das proteínas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Em ambientes alagados, a água funciona como barreira para a difusão do oxigênio atmosférico para o solo, tornando o ambiente hipóxico. Com a respiração das plantas submersas e dos microrganismos, o oxigênio é consumido criando uma condição de anoxia. Neste ambiente, o metabolismo respiratório das plantas é afetado devido à ausência do acceptor final de elétrons, paralisando assim, o ciclo de Krebs (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992; Fox, Kennedy e Rumpho, 1994). Deste modo a glicólise segue a via fermentativa, com a conversão do piruvato em etanol e  $\text{CO}_2$  ou lactato, concomitantemente com a oxidação do  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , permitindo alguma fosforilação ao nível de substrato e a produção de ATP, embora em menor proporção que em condições aeradas (Miernyk, 1990).

As plantas superiores, de maneira geral, são aeróbicas e têm requerimento absoluto de oxigênio para crescerem. Para que isto ocorra em anoxia, o aumento na taxa de fermentação é condição primordial para o suprimento de energia e proporcionar condições favoráveis para a manutenção dos processos metabólicos básicos da planta (Davies, 1980; Setter e Ella, 1994). Se a glicólise opera em via fermentativa, a produção de ATP decresce de 36 para 2 moles de ATP por mol de glicose, com isto a carga energética do adenilato decresce (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992). Entretanto, para que as plantas tolerem a anoxia e hipoxia, a carga energética do adenilato deve estar em níveis adequados (Couée et al. 1992) que propiciem a neossíntese de proteínas e

ácidos nucleicos, que são processos com alta demanda por energia na forma de ATP e GTP (Andrews et al., 1993).

A carga energética do adenilato de espécies tolerantes como o *Oryza* e *Echinochloa* transferidas de condições aeradas para anóxicas, têm um decréscimo nas primeiras vinte e quatro horas, estabilizando-se depois em valores próximos a 0.5, permanecendo estável por vários dias ou decrescendo vagarosamente (Crawford, 1992). Para compensar ainda que parcialmente o decréscimo na síntese de ATP, em alguns casos há uma aceleração no metabolismo glicolítico caracterizado como efeito Pasteur (Hole et al., 1992). Isto faz dessa rota metabólica uma via dispendiosa em carboidratos, sendo que as espécies que toleram longos períodos em ambientes anaeróbicos possuem tipicamente, grandes reservas de açúcares (Crawford, 1992).

Em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, a capacidade de sobrevivência das plantas varia entre as espécies. Plantas de batata e de milho por exemplo não sobrevivem por mais de três dias quando o tubérculo e raízes, respectivamente, permanecem sob anoxia (Andrews et al., 1994 b; Sachs, Freeling e Okimoto, 1980) ao passo que plântulas de açaí permaneceram vivas durante 16 dias, totalmente submersas em água livre de oxigênio (Neto, Alves e Oliveira, 1995 b). Sementes dessa mesma espécie não germinaram durante o período de 38 dias de anoxia, mas permaneceram viáveis, uma vez que retomaram o processo germinativo após o retorno das condições de aeração do meio (Neto, Alves e Oliveira, 1995 a). Para períodos mais prolongados a literatura registra poucas espécies capazes de germinar e crescer sob condições restritas de anoxia. É o caso de quatro espécies do gênero *Echinochloa* e *Oryza sativa* (Fox, Kennedy e Rumpho, 1994; Mujer et al., 1993; Zhang et al. 1994) e de *Acorus calamus* (Bucher e Kuhlemeier, 1993) que toleram de quatro a oito semanas em anoxia, respectivamente.

A tolerância à anoxia está estreitamente relacionada com a ação coordenada de adaptações morfológicas, anatômicas e bioquímicas (Drew e Stolzy, 1991; Bucher e Kuhlemeier, 1993). Já foi estabelecido que o estresse anaeróbico induz mudanças no padrão protéico em várias espécies. Isto ocorre porque a síntese de proteínas é alterada devido à dissociação dos polirribossomos, impossibilitando a tradução do mRNA e afetando, de uma maneira geral, o metabolismo e o nível energético celular (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992; Mujer et al., 1993). Quando ocorre tradução, esta se dá de maneira preferencial nos transcritos que codifiquem os polipeptídeos anaeróbicos (Andrews et al., 1993; Sachs, Freeling e Okimoto, 1980; Bailey-Serres, Kloeckener-Gruissem e Freeling, 1988).

Ao nível metabólico, a baixa disponibilidade de oxigênio induz alterações na expressão de genes nas plantas. Um grupo de 20 polipeptídeos, designado por Sachs, Freeling e Okimoto (1980) de polipeptídeos anaeróbicos (ANP's) foram seletivamente sintetizados em raízes primárias de milho após cinco horas de anoxia. No mesmo tempo, a síntese de proteínas aeróbicas foi, na sua maioria reprimida. Esses polipeptídeos anaeróbicos têm sido bastante estudados em milho e de maneira geral estão envolvidos na glicólise e fermentação, tais como álcool desidrogenase (Sachs e Freeling, 1978; Russel e Sachs, 1992; Andrews et al., 1993), lactato desidrogenase (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992), piruvato descarboxilase (Wignarajah e Greenway, 1976; Lazlo e Lawrence, 1983) e frutose-1,6 bisfosfato aldolase (Kelley e Freeling, 1984). Ainda que os três primeiros sistemas sejam os mais estudados (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992), Crawford (1992) cita que o fenômeno mais associado com o déficit de oxigênio é a indução da síntese e da atividade da álcool desidrogenase, confirmando os dados de Sachs e Freeling (1978) onde esta enzima é o principal polipeptídeo anaeróbico sintetizado no milho em tal condição.

A enzima álcool desidrogenase é constituída por duas isoenzimas sendo que a isoforma álcool desidrogenase 1 é a principal em termos de atividade e quantidade, atuando como uma desidrogenase terminal que regenera o poder oxidante na ausência de oxigênio (Okimoto et al., 1980). Aparentemente, essa enzima não é requerida para o crescimento do milho em condições aeradas, contudo os estudos com mutantes que não possuem o gene que codifica para a álcool desidrogenase 1 permitiram a confirmação da essencialidade desta enzima para a sobrevivência do milho durante o alagamento (Lemke-Keyes e Sachs, 1989).

Em espécies tolerantes de *Echinochloa* e *Oryza* Mujer et al., (1993) conseguiram distinguir cinco classes de proteínas cuja expressão varia conforme o nível de oxigênio no meio. Bucher e Kuhlemeier (1993) estudando a expressão dos genes que codificam para a álcool desidrogenase verificaram em *A. calamus* a presença de dois grupos de isoenzimas de álcool desidrogenase, um presente constitutivamente e outro induzido durante a anoxia. Por outro lado em soja, Newman e Van Toai (1992) verificaram que a álcool desidrogenase é um polipeptídeo codificado por três genes sendo que um é expresso constitutivamente em todos os órgãos da plântula, outro expresso constitutivamente em órgãos anaeróbicos e o terceiro expresso predominantemente em raízes anaeróbicas.

Vários autores (Bayley-Serres, Kloeckener-Gruissem e Freeling, 1988 e Freeling e Bennett, 1985) citam que a atividade da álcool desidrogenase é detectável apenas em tecidos aclorofilados, contudo Kimmerer e Mac Donald (1987) e Kimmerer (1987) relatam a presença da álcool desidrogenase em folhas de várias espécies. Neste aspecto, Kennedy, Rumpho e Fox (1992) e Cobb e Kennedy (1987) sugerem que nas espécies tolerantes a anoxia, dois terços da atividade da álcool desidrogenase são detectados nas folhas, enquanto que nas espécies sensíveis dois terços da atividade estão presentes nas raízes.

A enzima lactato desidrogenase ocorre normalmente em diversos tecidos vegetais na forma de múltiplas isoenzimas (Hoffman e Hanson, 1986) tendo uma participação determinante na tolerância ao estresse anaeróbico. Alguns autores afirmam que a glicólise por via láctica está limitada a fase de transição entre o metabolismo aeróbico e a fermentação etanólica (Davies, Grego e Kenworthy, 1978; Rivoal e Hanson, 1994). No entanto, Betsche (1983) observou uma produção de lactato nas folhas de várias espécies, indicando que esta enzima atua normalmente mesmo não estando em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio.

Ainda com relação à lactato desidrogenase, foi observado que sua atividade aumenta a medida que decresce o teor de oxigênio no meio, sendo que o lactato formado, é encontrado em maiores quantidades no meio, como produto de sua excreção. Entretanto para que a excreção do lactato aconteça, deve haver um sistema de transporte específico do mesmo a nível de membrana plasmática (Rivoal e Hanson, 1993). Para Xia e Roberts (1994), a aclimatação dos tecidos ao déficit de oxigênio aumenta a eficiência de excreção do lactato, pois envolve a síntese de transportadores de lactato, que permanecem funcionais durante a anoxia, evitando assim que a acidose citoplasmática alcance níveis irreversíveis de danos às células (Hoffman, Bent e Hanson, 1986; Xia e Saglio, 1992).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção do material vegetal

As plantas utilizadas neste trabalho estão sendo estudadas dentro do programa UFLA/CEMIG/FAEPE, com o objetivo de revegetar áreas de depleção em reservatórios hidroelétricos e foram selecionadas de acordo com o comportamento observado em estudos prévios de crescimento, rusticidade e ocorrência em ambientes alagados (Tabela 1).

TABELA 1: Espécies que foram estudadas previamente em condições de alagamento.

ESPÉCIE	CONDIÇÃO DE ALAGAMENTO	REFERÊNCIA
<i>Brachiaria mutica</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Brachiaria radicans</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Brachiaria radicans x B. mutica</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Digitaria suazilandensis</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Echinochloa polystachia</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Echinochloa pyramidalis</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Panicum repens</i>	represa hidrelétrica	Oliveira, 1994
<i>Melinis minutiflora</i>	represa hidrelétrica	Pelacani, 1993
<i>Polygonum acuminatum</i>	represa hidrelétrica	Pelacani, 1993

Foram coletadas do painel de gramíneas do Departamento de Biologia da UFLA *Echinichloa polystachia*, *Echinochloa pyramidalis*, *Brachiaria radicans*, *B. mutica*, *B. radicans* x *mutica*, *Panicum repens*, *Digitaria suazilandensis*, *Melinis minutiflora* e *Pogostemum sp* e no reservatório hidroelétrico de Camargos em Itutinga-MG, a poligonácea *Polygonum acuminatum*. Em seguida, os propágulos vegetativos foram colocados em germinadores em condições ambientais, irrigados diariamente com água de torneira de onde obtiveram-se as mudas, que de maneira geral, apresentavam-se com quatro a seis lançamentos foliares.

Após a coleta das mudas, estas foram lavadas em água corrente e tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,1% por cinco minutos, após o que foram novamente lavadas em água destilada e colocadas em vidros com aproximadamente 650 mL de solução nutritiva (Oliveira, 1979) modificada por Pelacani (1993), diluída 1:5 de modo que ficassem totalmente submersas, sendo em seguida submetidas aos tratamentos anóxico e aerado. O tratamento anóxico que foi realizado conforme a metodologia proposta por Neto, Alves e Oliveira (1995 a), consistiu da aplicação de vácuo por duas vezes durante cinco minutos. Em seguida, os vidros foram fechados com uma tampa de borracha com dois orifícios. Por um dos orifícios foi introduzido um tubo plástico por onde borbulhou-se nitrogênio a uma vazão de  $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , por dois minutos, e imediatamente a tampa foi vedada com "parafilm". O tratamento aerado consistiu do borbulhamento constante de ar. Os vidros foram então alojados em sala de crescimento, onde permaneceram por 16 dias a uma temperatura média de  $25 \pm 3^\circ \text{C}$ , no escuro, para evitar a oxigenação do meio pela fotossíntese, conforme recomendação de Bucher e Kuhlemeier (1993) e Johnson, Cobb e Drew (1994). O delineamento experimental utilizado para esta fase foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, com uma planta por unidade experimental.

As avaliações da sobrevivência foram feitas todos os dias, de modo subjetivo, observando-se o vigor das plantas. Nestas ocasiões, a sala foi iluminada por um período mínimo de tempo necessário para completar a avaliação das plantas.

As espécies estudadas de acordo com seu comportamento, puderam ser agrupadas nos níveis de tolerância como: Sensíveis (*M. minutiflora*, *D. suazilandensis* e *Pogostemum sp*), intermediárias (*B. mutica*, *B. radicans*, *B. radicans x mutica*, *P. repens* e *E. pyramidalis*) e tolerantes (*P. acuminatum* e *E. polystachia*) (Figura 1).

### 3.2 Análise do Crescimento

Dentro de cada grupo foram selecionadas duas espécies, estabelecendo-se o tempo máximo de permanência como sendo de quatro dias para as espécies sensíveis (*M. minutiflora* e *D. suazilandensis*), oito dias para as intermediárias (*E. pyramidalis* e *B. mutica*) e doze dias para as tolerantes (*P. acuminatum* e *E. polystachia*).

Novas mudas das espécies selecionadas foram submetidas aos tratamentos aerado e anóxico, nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições e uma planta por unidade experimental.

Em intervalos de um, dois e três dias para as espécies sensíveis, intermediárias e tolerantes, respectivamente, avaliou-se o comprimento das plantas, medindo a distância entre o coleto e o ponto de inserção da última folha, de onde obteve-se o crescimento relativo (CR) pela relação entre o crescimento das plantas nos diversos períodos de avaliação e o tamanho inicial, de acordo com a expressão:

$$CR = \frac{Ct_1 - Ct_0}{Ct_0}$$

onde:

$Ct_0$  = Comprimento da planta no tempo zero

$Ct_1$  = Comprimento da planta nos diferentes tempos de avaliação.

### **3.3 Avaliação do vigor e da sobrevivência com o retorno às condições normais de aeração**

Um novo experimento em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e uma planta por unidade experimental foi destinado a avaliação do vigor ao final do tratamento e a sobrevivência das plantas ao retornarem para condições normais de aeração. Para tanto aplicou-se os tratamentos aerado e anóxico, descritos anteriormente, no período máximo estabelecido para cada grupo de tolerância. Ao final do experimento o vigor foi avaliado atribuindo-se subjetivamente notas no intervalo de zero a dez, considerando-se as plantas do tratamento aerado com nota dez, uma vez que permaneceram vigorosas durante todo o período experimental. Observou-se também se ocorreu a presença de odores de fermentação. Logo em seguida, as plantas foram transplantadas para caixas com areia, alojadas em condições de viveiro, onde foi verificada a sobrevivência das plantas durante uma semana após o transplântio.

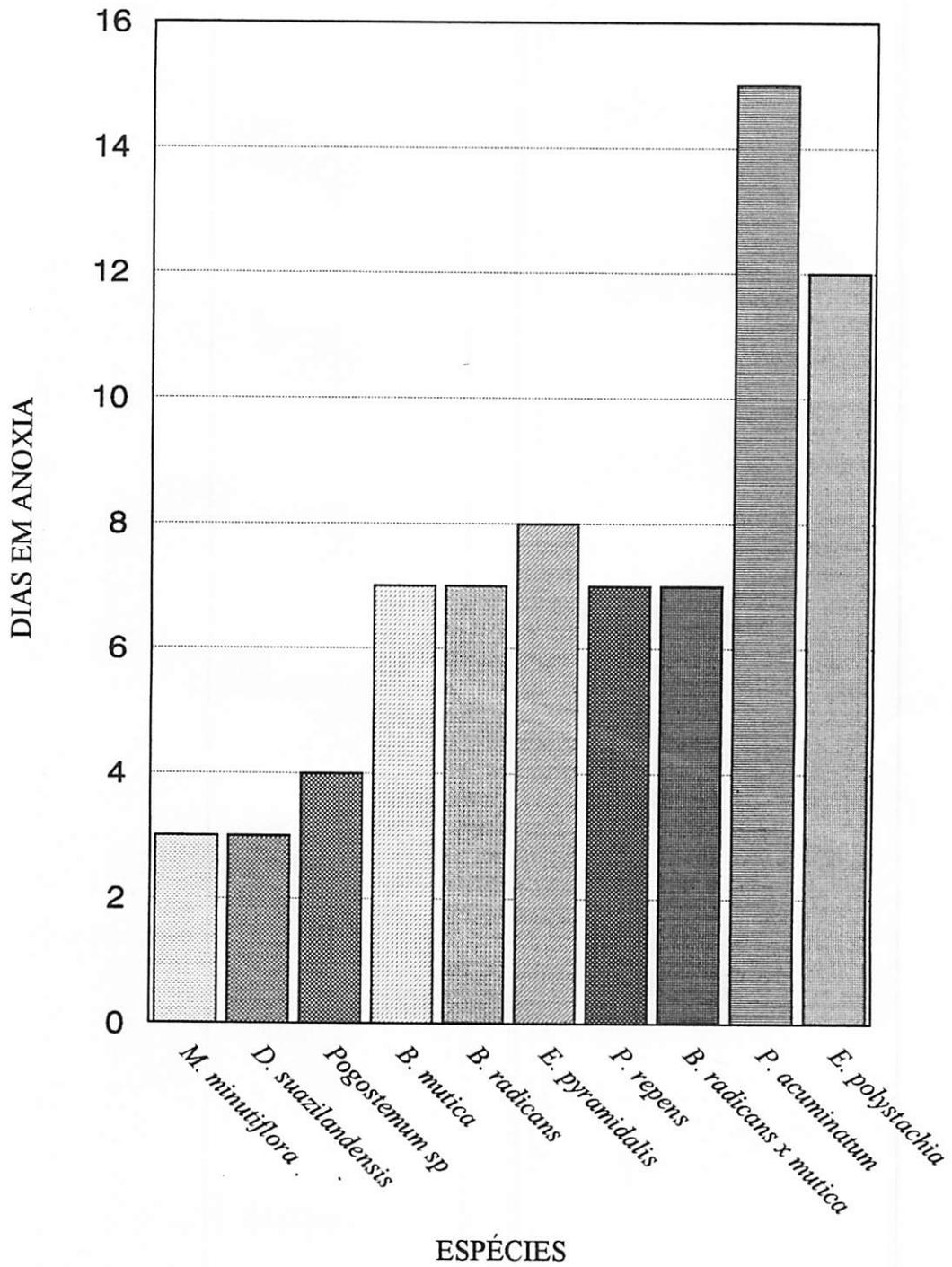


FIGURA 1. Período máximo de sobrevivência das espécies submetidas à anoxia.

### 3.4 Extração e quantificação da atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase

Após a avaliação do crescimento, as plantas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-10^{\circ}\text{C}$  para posterior avaliação do metabolismo anaeróbico.

A extração das proteínas foi feita em folhas e raízes homogeneizando-se o material vegetal na proporção de 100 mg de tecido por mililitro de meio extrator composto pelos seguintes componentes em  $\text{mol.m}^{-3}$  : Tris-HCl pH 6.8, 50 ;  $\text{Na}^{+}$  110; EDTA, 1; tiamina pirofosfato (TPP), 0.5;  $\text{Mg}^{+2}$  ,2.5 e ditioneitol (DTT), 2. O macerado obtido foi centrifugado a 20000g por 10 minutos a uma temperatura entre 0 e  $4^{\circ}\text{C}$  .

Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionadas em meio específico para as enzimas com volume final de 3 mL. O meio para a álcool desidrogenase foi composto em  $\text{mol.m}^{-3}$  por: tampão Tris-HCl , pH 8.9 50; ditioneitol (DTT) 2;  $\beta\text{NAD}$  0.25; e 100  $\mu\text{L}$  de etanol 96%. A reação foi quantificada na direção da oxidação do etanol (Bertani, Bambrilla e Menegus, 1980). O meio específico para a lactato desidrogenase foi composto em  $\text{m. mol}^{-3}$  por: tampão Tris-Glicina pH 9.9, 100; sulfato de hidrazina, 5; e lactato de sódio, 60. A reação foi quantificada na direção da oxidação do lactato (modificado de Hoffman e Hanson, 1986).

Após três minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ , a atividade das duas enzimas foi quantificada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 340 nm, utilizando-se como padrão soluções aquosas de  $\text{NADH} + \text{H}^{+}$  variando na faixa de  $5.10^{-3}$  a  $75.10^{-2}$   $\mu\text{moles}$ .

### **3.5 Quantificação do teor de proteínas solúveis**

Nos extratos obtidos para a avaliação da atividade enzimática, foi feita a quantificação do teor de proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976), que consistiu da adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato em cinco mL do reagente de Comassie (0,01% de Comassie blue G-250; 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol). Após cinco minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão foi feita utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão, na faixa de 20 a 100 $\mu\text{g}$ .

### **3.6 Avaliação do padrão eletroforético de proteínas**

Para as análises eletroforéticas, foram feitas extrações homogeneizando-se as folhas de plantas com até quatro dias de tratamento anóxico em nitrogênio líquido, utilizando uma proporção de 1 g de material vegetal para 3 mL de tampão de extração composto em  $\text{mol.m}^{-3}$  por: NaCl, 150; phenil-methyl-sulfonil fluoride (PMSF), 1; ácido ascórbico, 79 e polivinilpolipirrolidona (PVPP), 0,5%. A extração foi realizada com agitação em câmara fria (6 a 12°C) por pelo menos duas horas. Em seguida foi feita uma centrifugação a 20000g em temperatura entre 0 e 4° C por quinze minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana Miracloth e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976).

Foi feita a diálise em tampão carbonato de sódio 100  $\text{mol.m}^{-3}$ , pH 7.0 em seguida foi feita a liofilização dos extratos, que foram posteriormente ressuspensos para um volume final de 50 $\mu\text{L}$ . Em seguida os extratos foram aplicados em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) em gradiente linear de 10 a 18% (Walker, 1984) em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH

8.9 no gel separador e gel concentrador a 5% em tampão Tris-HCl 0,077 M, pH 6.8 .A corrida foi feita aplicando 100 volts até o azul de bromofenol chegar na extremidade inferior do gel, utilizando o tampão Tris-glicina pH 8.3 (Laemmli, 1970).

Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 e posteriormente corados com nitrato de prata a 0,15% (Bollag e Edelstein, 1991).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito do déficit de oxigênio no crescimento relativo

De maneira geral os dados obtidos na análise de crescimento confirmam o comportamento observado no experimento preliminar realizado para a seleção das plantas (Figura 1).

Das espécies estudadas, *P. acuminatum* (Figura 2A) e *E. polystachia* (Figura 2B) foram as que apresentaram maior crescimento em condições anaeróbicas, atingindo em relação ao tempo inicial um incremento de 35,0 e 61,0%, respectivamente. Ao contrário de *P. acuminatum*, que ao final do período experimental apresentou, sob anoxia, um decréscimo no crescimento de 43,0% em relação àquelas do tratamento aerado, o crescimento relativo da espécie *E. polystachia* ocorreu na mesma proporção para ambos os tratamentos. *E. polystachia*, por sinal, apresenta um crescimento extremamente adaptado sob condições naturais de alagamento na região de Itutinga-MG (Oliveira, 1994). De acordo com Piedade (1988), as maiores taxas de crescimento da parte aérea dessa mesma espécie, foram observadas justamente na época de alagamento na região Amazônica, atingindo a marca de quatro centímetros por dia.

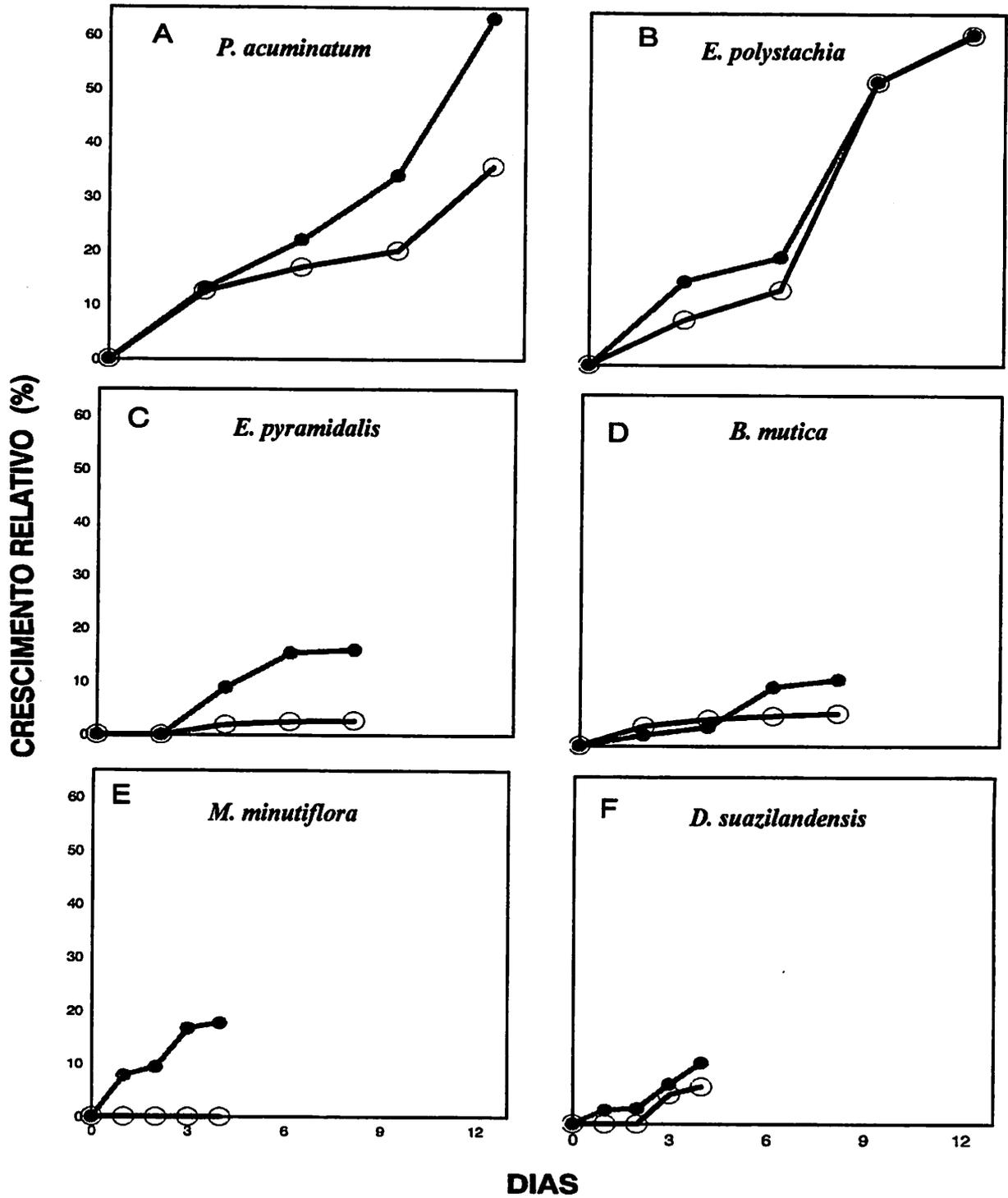


FIGURA 2. Crescimento relativo das seis espécies estudadas em tratamento aerado (círculo cheio) e anóxico (círculo vazio). Média de três repetições.

*E. pyramidalis* (Figura 2C) e *B. mutica* (Figura 2D) apresentaram comportamento distinto das espécies anteriormente citadas, caracterizado por uma redução de, respectivamente, 83,1 e 51,2% no crescimento em ambiente anóxico relativamente ao contínuo crescimento observado nas plantas do tratamento aerado.

De todas as espécies estudadas, *M. minutiflora* (Figura 2E) foi a única que apresentou paralisação do crescimento sob condições anaeróbicas. Durante os dois primeiros dias em anoxia, *D. suazilandensis* (Figura 2F) apresentou uma paralisação no seu crescimento seguido por uma fase de crescimento ativo, representando ao final do experimento 60,0% do crescimento das plantas sob aeração.

É importante salientar que as espécies *P. acuminatum*, *E. polystachia*, *B. mutica*, e *D. suazilandensis* apresentaram sob aeração um crescimento lento até a segunda avaliação, seguido por uma fase acelerada. Esta fase de crescimento lento também foi observada nas espécies *P. acuminatum*, *E. polystachia*, e *D. suazilandensis* sob anoxia. Este fato sugere que estas espécies passaram por um período de aclimação, uma vez que as mesmas foram transferidas de um ambiente com condições normais de aeração para um ambiente aquoso. Por outro lado *E. pyramidalis* apresentou sob aeração normal um comportamento distinto, caracterizado por fases de crescimento lenta, ativa e novamente lenta.

Ao final do décimo segundo dia de tratamento, as plantas de *P. acuminatum* submetidas ao tratamento anóxico apesar do menor crescimento observado em relação às aeradas (Figura 2A), foram as que apresentaram-se mais vigorosas, verdes e com aspecto semelhante ao das plantas do tratamento aerado (Tabela 2), embora sem emissão de novas raízes adventícias. Segundo Armstrong, Brändle e Jackson (1994), as raízes são particularmente sensíveis ao déficit de oxigênio no meio, sendo que o único relato na literatura, refere-se ao crescimento de raízes

primárias de *Trapa natans*. Este comportamento é semelhante ao de outras espécies reconhecidamente tolerantes, como o caso do arroz e de algumas espécies do gênero *Echinochloa*, que crescem sob ambientes anaeróbicos em função da expansão e alongamento celular (Vander Zee e Kennedy, 1981).

TABELA 2. Vigor e presença de odores de fermentação ao final do período experimental nas seis espécies estudadas submetidas à anoxia.

ESPÉCIE	TEMPO (DIAS)	CARACTERÍSTICA	
		VIGOR	ODOR
<i>P. acuminatum</i>	12	10	AUSENTE
<i>E. polystachia</i>	12	0	PRESENTE
<i>E. pyramidalis</i>	8	5	PRESENTE
<i>B. mutica</i>	8	7	PRESENTE
<i>M. minutiflora</i>	4	7	PRESENTE
<i>D. suazilandensis</i>	4	5	PRESENTE

Por outro lado, as plantas de *E. polystachia* apresentaram-se vigorosas até o nono dia. A partir daí, houve uma acelerada senescência caracterizada por clorose e necrose seguida de morte ao décimo segundo dia. As quatro espécies restantes apresentaram um comportamento intermediário ao das duas espécies anteriores, sendo que *B. mutica* e *M. minutiflora* foram mais vigorosas que *E. pyramidalis* e *D. suazilandensis*.

Observa-se pela tabela 2 que ao final do período experimental, foram detectados odores de fermentação provenientes das plantas do tratamento anóxico, exceto em *P. acuminatum*.

Plantas que toleram anoxia, segundo Cobb e Kennedy (1987) crescem preferencialmente a sua parte aérea . Esta característica representa uma resposta adaptativa importante , pois possibilitará alcançar rapidamente a atmosfera, permitindo assim, a difusão do oxigênio para as partes submersas se estas forem dotadas de aerênquimas. Isto representa um mecanismo de escape à ausência de oxigênio pois as plantas podem, mesmo sob alagamento, ter um suprimento de oxigênio suficiente para preservar o estado energético das células e conseqüentemente a manutenção dos processos metabólicos (Drew, Saglio e Pradet, 1985). Contudo, neste trabalho as plantas foram totalmente submersas em meio anóxico, sendo praticamente impossível qualquer contato com oxigênio externo e sem chances de recorrer a este mecanismo de escape à anoxia, quando elas o possuem. No entanto, das espécies estudadas somente *P. acuminatum* (Figura 2A) e *E. polystachia* (Figura 2B) poderiam se valer desse mecanismo, uma vez que conseguem crescer em níveis satisfatórios sob anaerobiose por um período de tempo relativamente longo.

#### **4.2 Sobrevivência das plantas ao retorno para condições normais de aeração**

Quando retornaram a condições normóxicas, as plantas que estavam completamente alagadas porém com aeração, a exceção de *M. minutiflora*, que apresentou uma taxa de sobrevivência de 40%, as plantas das demais espécies permaneceram todas vivas até o final do período de observação (Figura 3). Durante este mesmo período, dentre as plantas que estavam sob

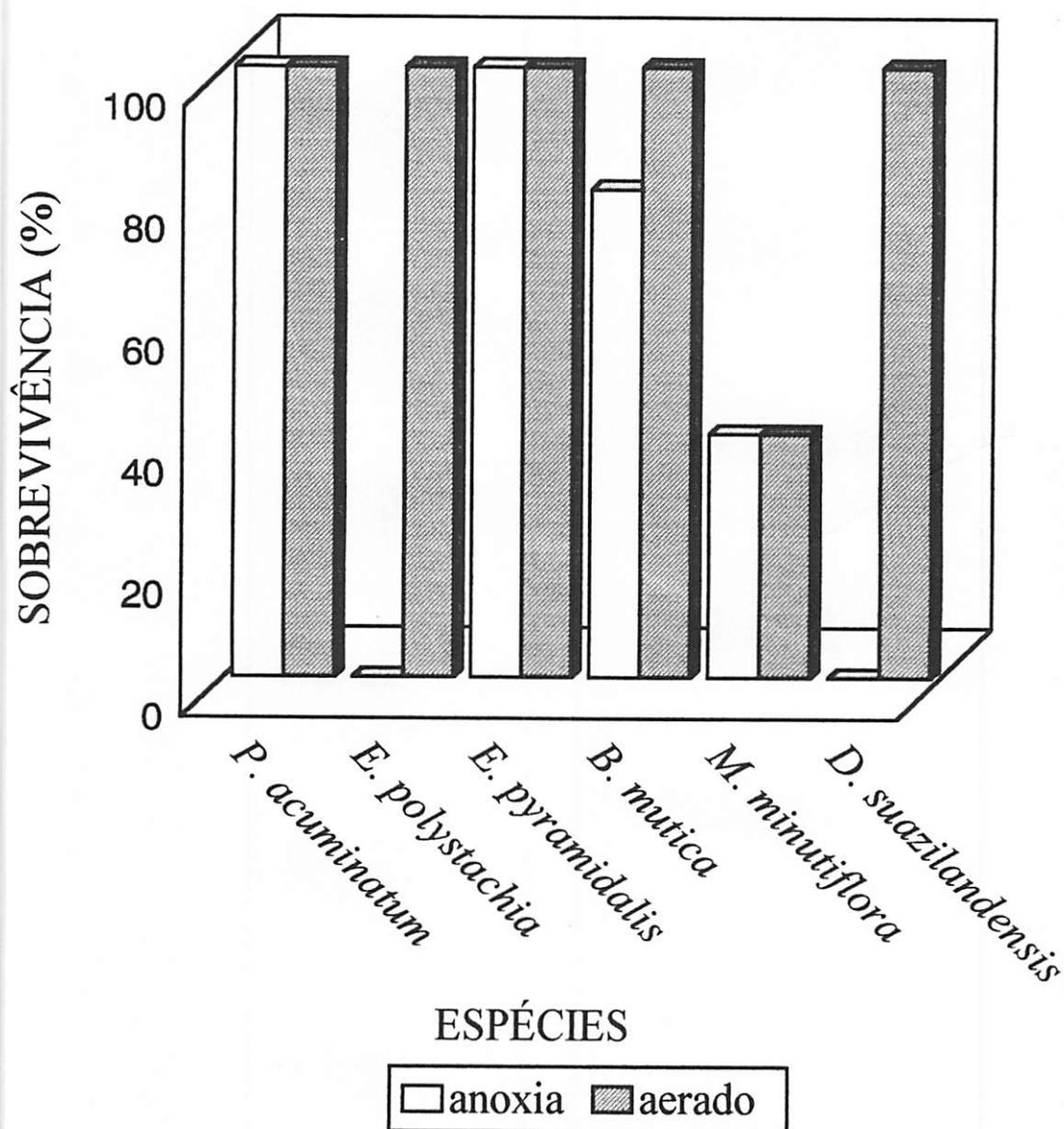


FIGURA 3. Sobrevivência das espécies após uma semana de retorno às condições normais de aeração.

anaerobiose, *P. acuminatum* e *E. pyramidalis* apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto que em *B. mutica* e *M. minutiflora* a sobrevivência foi de 80 e 40%, respectivamente e em *E. polystachia* e *D. suazilandensis* não houve sobrevivência.

De todas as espécies estudadas, *P. acuminatum* foi a única verdadeiramente tolerante à anoxia, por que permaneceu maior tempo em anoxia (15 dias) (Figura 1), conseguiu crescer durante o estresse, obteve nota máxima para o vigor (Tabela 2) e preservou sua integridade celular, com reflexo positivo na sua sobrevivência pós-anaerobiose (Figura 3). Este crescimento da parte aérea sob anaerobiose representa uma importante resposta adaptativa desta espécie, uma vez que sob condições naturais de alagamento a planta poderia alcançar a atmosfera, permitindo assim, a difusão de oxigênio para as partes submersas. Por outro lado *E. polystachia* que apresentou crescimento semelhante as que estavam em aeração (Figura 2B), não conseguiram sobreviver pós anoxia (Figura 3). Estes resultados indicam que os doze dias de estresse foram muito longos para esta espécie, fazendo com que ela provavelmente tivesse suas reservas esgotadas, levando a uma perda suficientemente forte em seu vigor para que não sobrevivesse.

Já *E. pyramidalis* que recebeu nota cinco para o vigor, também apresentou 100% de sobrevivência enquanto que 80 % das plantas de *B. mutica* que receberam nota sete, sobreviveram. Estes resultados mostram que apesar destas espécies terem sido afetadas parcialmente em seu vigor pela condição anaeróbica, foram capazes de se recuperar pós-anaerobiose. Esta sobrevivência possivelmente esteja relacionada a sua menor taxa de crescimento durante o período de anaerobiose, o que proporcionou uma economia de reservas, que foram utilizadas para o crescimento com o retorno às condições normais do ambiente, fato que não ocorreu com *E. polystachia* e *D. suazilandensis*. As espécies que mostraram-se sensíveis ao estresse foram *M. minutiflora* e *D. suazilandensis*, já que elas praticamente não cresceram sob

anoxia juntamente com o comprometimento de seu vigor e sobrevivência . Pelacani (1993) estudando a incidência de plantas provenientes de banco de sementes de esterco bovino utilizado para adubação de covas destinadas ao plantio de mudas para a revegetação de áreas de depleção, que são constantemente sujeitas à inundações periódicas, observou que a incidência de *M. minutiflora* foi anulada após a inundação em relação ao período anterior.

A tolerância à anoxia envolve tanto a sobrevivência das plantas em ambiente privado de oxigênio quanto o seu retorno para ambientes com condições normais de aeração (Myernik, 1990). Contudo a reexposição ao ar pode gerar radicais superóxido e o sucesso do retorno se deve a níveis adequados das enzimas superóxido dismutase, catalases e peroxidases e da presença de antioxidantes naturais como a glutatona e o ácido ascórbico (Albrecht e Wiedenroth, 1994). Em *Iris pseudacorus* os altos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase são citados como os responsáveis por seu sucesso à reexposição ao ar (Monk, Fargsted e Crawford, 1987). Possivelmente *P. acuminatum*, *E. pyramidalis* e *B. mutica* além dos mecanismos para a economia das reservas energéticas, possuíssem níveis adequados dessas enzimas e antioxidantes para garantir a sobrevivência com o retorno à aeração, como ocorre com outras espécies que toleram hipoxia e anoxia (Armstrong, Brändle e Jackson, 1994). Segundo Scandalios (1993), a viabilidade das espécies desprovidas desses mecanismos é perdida rapidamente por danos causados por radicais como mutações, disfunções das enzimas e danos oxidativos aos lipídeos e membranas, levando à perda do conteúdo celular.

### 4.3 Efeito do déficit de oxigênio no teor de proteínas

Tanto nas espécies estudadas quanto em seus órgãos, observou-se um comportamento diferenciado do teor de proteínas em resposta à anoxia. Nas raízes de *P. acuminatum* (Figura 4A) não houve diferenças no teor de proteínas entre os tratamentos aerado e anóxico sendo os níveis detectados em valores próximos a zero e sem flutuações durante todo o período experimental. Nas folhas de plantas sob aeração houve um decréscimo linear no teor de proteínas durante todo o período experimental enquanto que no tratamento anóxico, observou-se um decréscimo até o terceiro dia seguido de aumentos até chegar em níveis semelhantes aos iniciais, porém maiores que aqueles observados em folhas aeradas. Estes resultados sugerem um rearranjo da maquinaria metabólica resultando na síntese de polipeptídeos anaeróbicos nas folhas, que são provavelmente os responsáveis pelo sucesso desta espécie em ambientes deficientes em oxigênio. Com isto possibilitou-se a conservação da integridade celular, garantindo o crescimento (Figura 2A), o vigor (Tabela 2) durante o estresse e a sobrevivência (Figura 3) com o retorno à condições normais de aeração. Para Moquot et al. (1981) existe uma forte correlação entre a capacidade de manter os níveis de proteínas em condições de baixa disponibilidade de oxigênio com a manutenção da carga energética do adenilato.

Em *E. polystachia* (Figura 4B) não houve diferenças nos teores de proteínas em ambos os órgãos, entre os tratamentos anóxico e aerado. Nas raízes ocorreu um pequeno decréscimo no teor de proteínas até o terceiro dia, estabilizando em seguida até o final do período, enquanto que nas folhas houve uma queda progressiva no teor de proteínas para ambos os tratamentos, que oscilaram até o final do experimento. Este fato sugere que a síntese de polipeptídeos anaeróbicos não ocorreu em níveis suficientemente elevados para garantir a sua

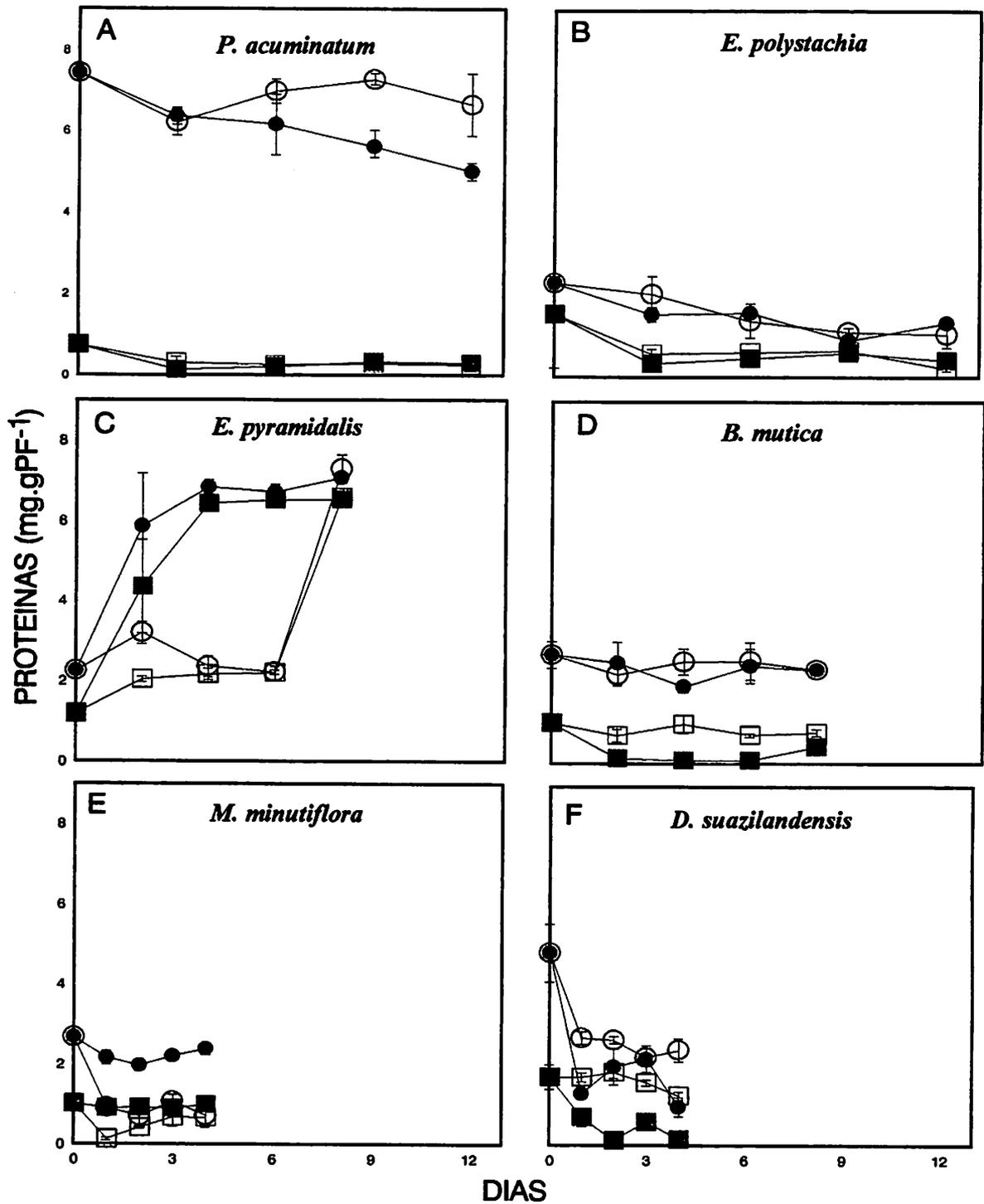


FIGURA 4. Teor de proteínas solúveis nas folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas sob tratamento aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão da média.

integridade celular durante o período de doze dias em anoxia, pois até o nono dia, as plantas não apresentavam características tão expressivas da perda de seu vigor. A alta taxa de crescimento que as plantas de *E. polystachia* vinham experimentando até então (Figura 2B), deve ter esgotado suas reservas levando-a a um colapso celular, impedindo seu restabelecimento quando submetidas às condições aeradas (Figura 3).

O teor de proteínas tanto da folha quanto da raiz de *E. pyramydalis* (Figura 4C) apresentou um comportamento semelhante. Sob aeração houve um aumento significativo até o quarto dia, estabilizando em seguida em níveis três vezes maiores que o inicial. No tratamento anóxico, o teor protéico permaneceu constante até o sexto dia, quando houve um incremento significativo alcançando ao final do experimento, os níveis do tratamento aerado. Tanto o crescimento das plantas (Figura 2C), quanto os teores de proteínas foliar e radicular sob ambiente anóxico foi menor que aqueles observados no tratamento aerado. Este comportamento sugere a inibição de síntese de proteínas com um posterior redirecionamento para o metabolismo fermentativo. Novamente fica caracterizada, ainda que tardiamente, uma alta síntese de polipeptídeos anaeróbicos tanto nas raízes quanto nas folhas, necessários para que a planta conseguisse sobreviver com o retorno às condições normóxicas (Figura 3).

Em folhas de *B. mutica* o teor de proteínas foi, de maneira geral, semelhante para ambos os tratamentos, não variando durante todo o período experimental (Figura 4D). Quanto as raízes, no tratamento aeróbico, o teor protéico manteve-se quantitativamente em um nível inferior que o do tratamento anóxico o qual permaneceu próximo ao nível inicial, porém sempre inferiores aos das folhas. O crescimento dessa espécie foi reduzido em anoxia (Figura 2D), contudo o teor de proteínas nas folhas não foi afetado, indicando que essa manutenção foi necessária para garantir as exigências dos mecanismos de sobrevivência com o retorno à aeração (Figura 3).

Em *M. minutiflora* o tratamento sem oxigênio afetou o teor de proteínas nas folhas (Figura 4E), mantendo o nível bem menor que o do tratamento aerado, que foi mantido durante todo o período experimental. Este decréscimo no teor protéico deve ter sido um dos fatores determinantes da paralisação do crescimento dessa espécie em anoxia (Figura 2E). Nas raízes, o tratamento aerado manteve o nível constante enquanto que houve uma pequena queda no teor de proteínas no primeiro dia de tratamento anóxico com elevação do nível, até alcançar aquele do tratamento aerado.

Nas folhas de *D. suazilandensis* sob aeração, houve um decréscimo significativo no nível de proteínas durante o primeiro dia de tratamento (Figura 4F), contudo no tratamento anóxico o nível de proteínas após a queda foi mantido acima do nível do tratamento aerado. Apesar do teor protéico ter sido maior em anoxia não houve sobrevivência com o retorno à aeração (Figura 3) que pode ter sido em decorrência do crescimento ocorrido, mesmo que em proporção menor que o tratamento aerado, consumindo reservas de essencial importância para seu restabelecimento pós anaerobiose. As raízes em condições anaeróbicas mantiveram o nível durante todo o período experimental. Nas raízes aeradas houve um decréscimo significativo até o quarto dia.

À exceção de *E. pyramidalis* que apresentou um aumento no teor protéico nos seus órgãos nos dois tratamentos, nas demais espécies o teor caiu, ou manteve-se inalterado, demonstrando que a síntese foi afetada. Alternativamente pode-se atribuir a redução no teor protéico a degradação das proteínas pela síntese e/ou ativação de proteases, que normalmente acontece em baixas tensões de oxigênio (Neuman e Van Toai, 1991).

Mocquot et al. (1981), Sachs, Freeling e Okimoto (1980) sugerem que a eficiência de plantas que sobrevivem por vários dias em anoxia se deve provavelmente a um redirecionamento

da maquinaria para a síntese de proteínas nas folhas durante o estresse, de forma a garantir um mínimo de energia necessária para a manutenção de vias metabólicas alternativas para a produção de ATP. As diferenças observadas no comportamento entre as espécies e entre os órgãos já foram detectadas em outras pesquisas (Andrews et al., 1994 b; Cobb e Kennedy, 1987), e podem ser atribuídas a diferentes estratégias de resposta ao estresse. Variações também podem ocorrer devido a diferenças na idade dos tecidos e da existência ou não pré-tratamento hipóxico (Andrews et al., 1994 a).

#### **4.4 Efeito do déficit de oxigênio na atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato desidrogenase**

Nas seis espécies estudadas foram detectadas as atividades da enzima álcool desidrogenase (Figura 5) e da lactato desidrogenase (Figura 6) em folhas e raízes desde o tempo zero, indicando que nestas espécies, são enzimas constitutivas. De maneira geral, não foram detectadas diferenças entre as atividades da álcool desidrogenase e da lactato desidrogenase nas raízes de plantas sob tratamento aerado e anóxico. Com o decorrer do período experimental houve a manutenção ou a redução da atividade das enzimas nas folhas, sendo que estas apresentaram comportamento semelhante entre algumas espécies que podem ser descritas em três classes distintas. Na primeira classe constituída por *P. acuminatum* (Figura 5A e 6A), *M. minutiflora* (Figura 5E e 6E) e *D. suazilandensis* (Figura 5F e 6F) a atividade das enzimas, independentemente do tratamento aplicado, apresentou-se durante todo o período, maior nas folhas que nas raízes. A ausência de oxigênio no entanto, ao contrário de *P. acuminatum* que não alterou a atividade em relação às aeradas, promoveu nas folhas de *M. minutiflora* menor

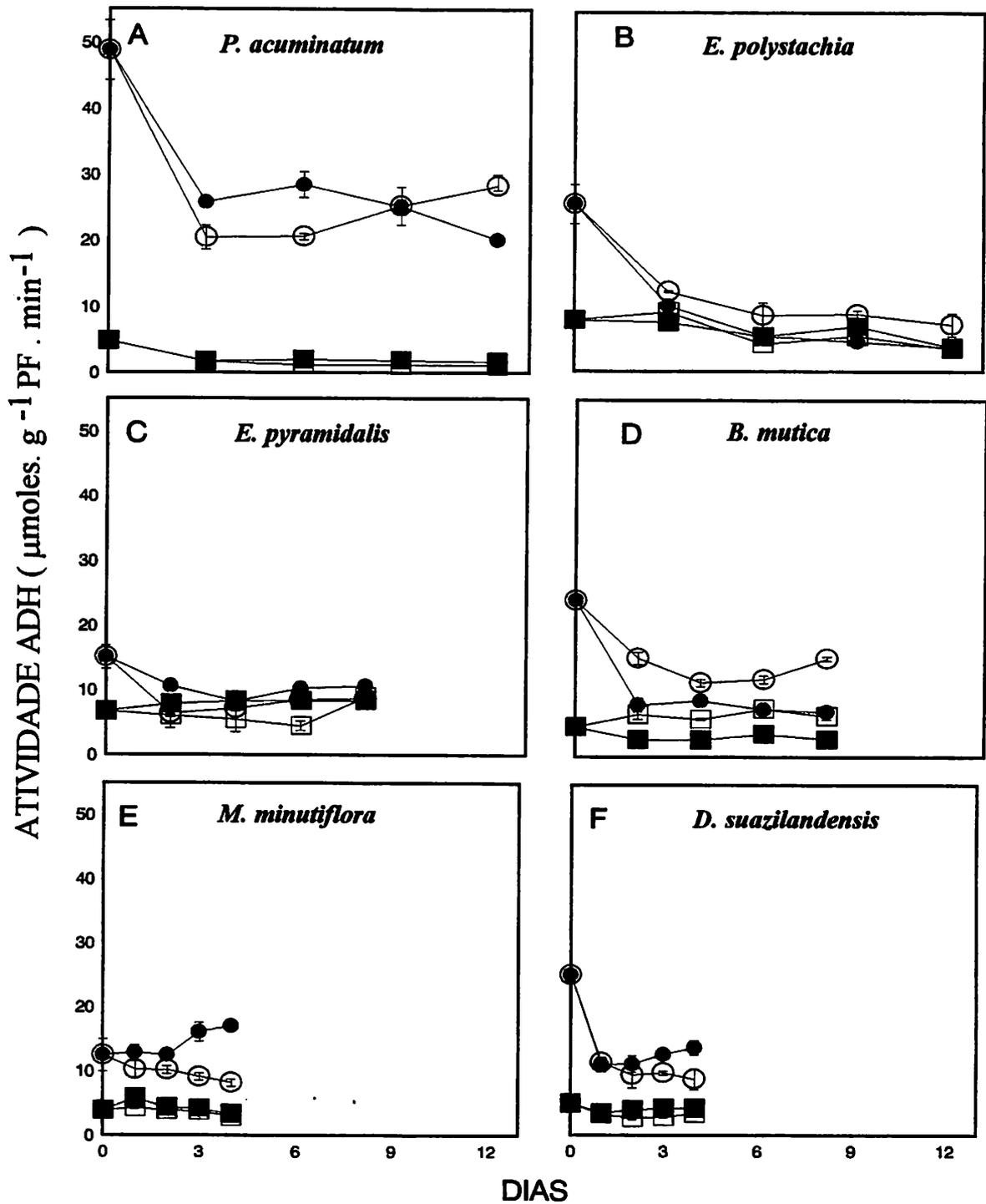


FIGURA 5. Atividade da enzima álcool desidrogenase em folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas submetidas ao tratamento aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão da média.

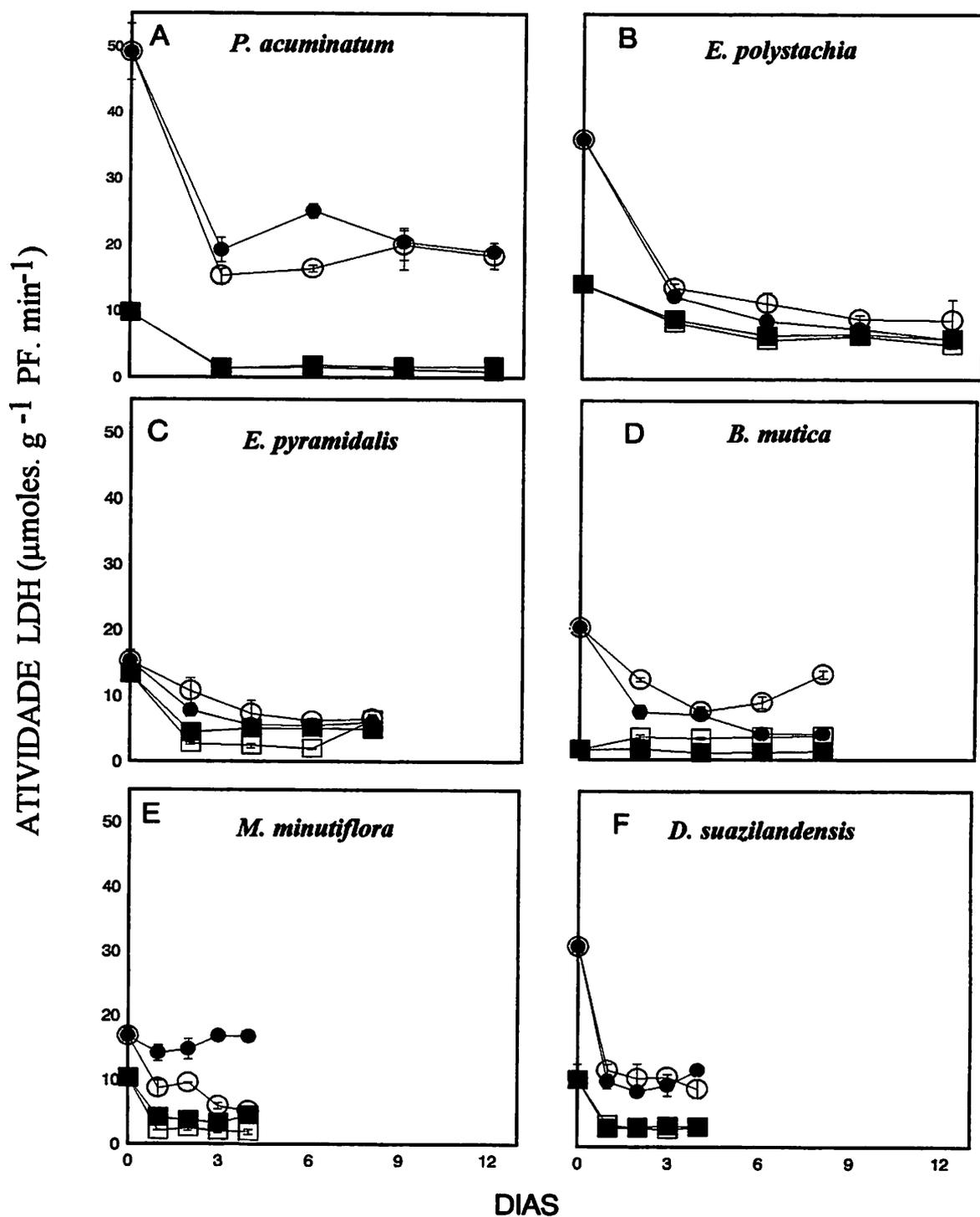


FIGURA 6. Atividade da enzima lactato desidrogenase em folhas (o) e raízes (□) das seis espécies estudadas submetidas aos tratamentos aerado (cheio) e anóxico (vazio). Média de três repetições  $\pm$  erro padrão da média.

atividade de ambas as enzimas e em *D. suazilandensis* a menor atividade da álcool desidrogenase. Para *E. polystachia* (Figura 5B e 6B) e *E. pyramidalis* (Figura 5C e 6C), o nível de atividade das duas enzimas nas folhas caiu ao nível da raiz, a partir da segunda avaliação. *B. mutica* foi a única espécie que apresentou, em anoxia, maior atividade que sob condições aeradas (Figura 5D e 6D).

Dentro da primeira classe, *P. acuminatum* foi a única espécie que apresentou nas folhas, independentemente do tratamento aplicado, maiores níveis de proteína (Figura 4A) e de atividade enzimática (Figuras 5A e 6A). Em condições de anoxia, há uma relação quantitativa entre o valor da carga energética e o nível de atividade metabólica das vias fermentativas (Saglio, Raymond e Pradet, 1980), então o comportamento desta espécie revela um metabolismo anaeróbico ativo, que permite a manutenção da produção de ATP e reciclagem do poder redutor sob tratamento anaeróbico, essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Neste caso, observa-se que *P. acuminatum* cresceu durante a anaerobiose (Figura 2A), bem como sobreviveu no período após o estresse (Figura 3). Por outro lado, o decréscimo na carga energética do adenilato e o acúmulo de poder redutor em decorrência da menor atividade da álcool desidrogenase e da lactato desidrogenase em folhas de *M. minutiflora* e a menor atividade da álcool desidrogenase em folhas de *D. suazilandensis* poderia explicar, em parte, a sensibilidade dessas espécies ao déficit de oxigênio. Para *M. minutiflora* o vigor deve ter sido garantido pela paralisação do crescimento em ambiente livre de oxigênio, mas foi insuficiente para garantir a sobrevivência das plantas ao retornarem para as condições normais de aeração (Figura 3).

Na segunda classe constituída por *E. polystachia* e *E. pyramidalis*, a baixa atividade das enzimas (Figura 5B e 6B) e a queda no teor de proteínas em *E. polystachia* possivelmente conduziu a uma queda na carga energética do adenilato que poderia ter sido acentuada pelo alto crescimento relativo desta espécie que foi de igual magnitude para ambos os tratamentos (Figura

2B), causando com isto um esgotamento de suas reservas (Figura 3B) e impedindo assim a manutenção do seu vigor (Tabela 2) e da sua sobrevivência com o término do tratamento aerado (Figura 3). Por outro lado em *E. pyramidalis*, esta mesma queda na carga energética do adenilato poderia ter sido atenuada pelo menor crescimento em anaerobiose (Figura 2C) e pelo aumento do teor de proteína entre o sexto e o oitavo dia de estresse, que neste caso poderia ser atribuído à síntese de outros polipeptídeos anaeróbicos . Isto garantiria a sobrevivência (Figura 3), contudo sem manter um alto vigor (Tabela 2).

Na espécie representativa da terceira classe, *B. mutica*, observa-se que a mesma manteve vigor e sobreviveu ao estresse anaeróbico, possivelmente devido ao ajuste metabólico que neste caso seguiu preferencialmente para ambas as rotas fermentativas.

Estes resultados com relação à atividade da enzima álcool desidrogenase concordam com os de Cobb e Kennedy (1987), onde o aumento na atividade da álcool desidrogenase não é, necessariamente um indicativo da habilidade da sobrevivência de um organismo em anaerobiose, pois pode ocorrer tanto em espécies tolerantes como em não tolerantes à baixa disponibilidade de oxigênio, entretanto diferem dos resultados de Okimoto et al. (1980), onde a atividade desta enzima é induzida apenas em raízes anaeróbicas. A atividade da ADH não está relacionada com os níveis de mRNA para esta enzima em raízes primárias de milho, pois enquanto há um aumento rápido da transcrição seguido de um declínio, a atividade enzimática continua aumentando cerca de 48 horas, indicando que a relação depende da duração da anoxia (Andrews et al., 1994 a).

Vários autores citam que a fermentação láctica está limitada à fase de transição entre o metabolismo aeróbico e a fermentação etanólica , o que pode estar restrito a alguns minutos após a exposição à baixas tensões de oxigênio (Davies, 1980; Rivoal e Hanson, 1994). Em camadas de aleurona de cevada em hipoxia nas primeiras oito horas há uma indução considerável da atividade

da lactato desidrogenase, ocorrendo um forte declínio quando os níveis de oxigênio são reduzidos a 0% (Hanson e Jacobsen, 1984). Contudo em raízes de algumas espécies do gênero *Limonium* a fermentação do lactato é sustentada durante uma anoxia prolongada (Rivoal e Hanson, 1993). Em *Euterpe oleracea*, Neto, Alves e Oliveira (1995 a) observaram que a atividade da lactato desidrogenase foi sempre maior do que a atividade da álcool desidrogenase em todos os órgãos estudados, desviando a glicólise, preferencialmente, para a produção de lactato.

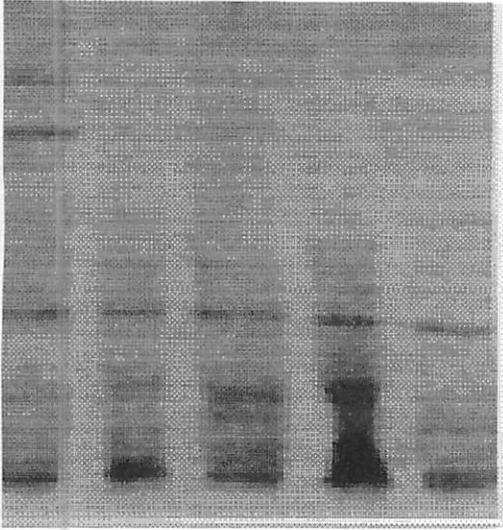
Para as espécies estudadas houve uma concordância com os dados de Betsche (1983), que observou atividade da lactato desidrogenase em folhas de várias espécies em condições normais de oxigênio e sugeriu que nestas espécies, a lactato desidrogenase não tem uma participação direta no metabolismo anaeróbico.

A diversidade nas respostas ao estresse anaeróbico é um fato presente em vários trabalhos, sugerindo complexidade na interação dos mecanismos que controlam o metabolismo anaeróbico. Umeda e Uchimiya (1994) concordam com esta premissa e explicam que isto envolve a concentração do produto e substrato, a síntese e degradação de enzimas, a ativação e repressão enzimática e a taxa de transcrição dos genes relacionados com a glicólise e a estabilidade destes transcritos.

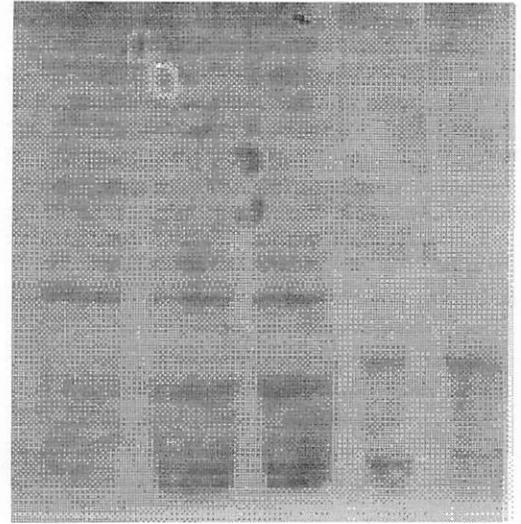
#### **4.5 Influência do déficit de oxigênio no padrão eletroforético de proteínas**

Dentre as espécies estudadas apenas *P. acuminatum* e *M. minutiflora* não apresentaram resolução no gel, sendo que foram prejudicadas pela presença de grandes quantidades de compostos fenólicos e baixíssimas concentrações de proteínas, provavelmente devido às degradações ocorridas durante o período de armazenamento do material vegetal.

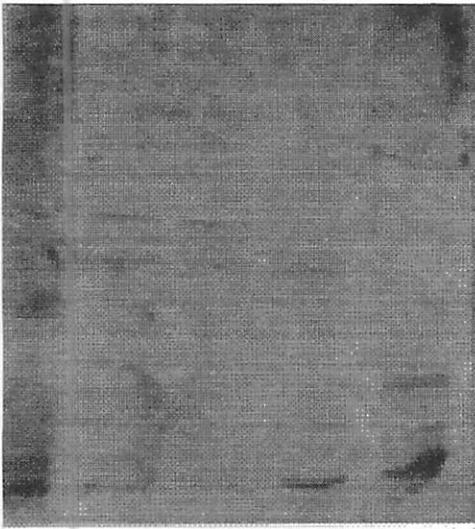
O padrão eletroforético das proteínas sofreu várias modificações, à exemplo dos resultados obtidos em raízes primárias de milho por Sachs, Freeling e Okimoto (1980) e algumas espécies do gênero *Echinochloa* (Mujer et al., 1993). Com o decorrer da imposição do tratamento a maioria das proteínas desapareceram, enquanto outras apareceram reafirmando a interrupção do metabolismo aeróbico e ativação do metabolismo anaeróbico. As proteínas que desapareceram são exclusivas à condições normais de oxigênio. Várias das proteínas que são estimuladas pelo estresse anóxico foram reconhecidas como enzimas glicolíticas e fermentativas ou envolvidas no metabolismo da glicose-fosfato (Sachs e Ho, 1986). Algumas proteínas permaneceram durante a anoxia demonstrando sua natureza constitutiva, à exemplo da álcool desidrogenase em *D. suazilandensis* (Figura 7), que estava presente desde o tempo zero, sofrendo um decréscimo na sua concentração, com reflexos na queda de sua atividade.

*Echinochloa polystachia*

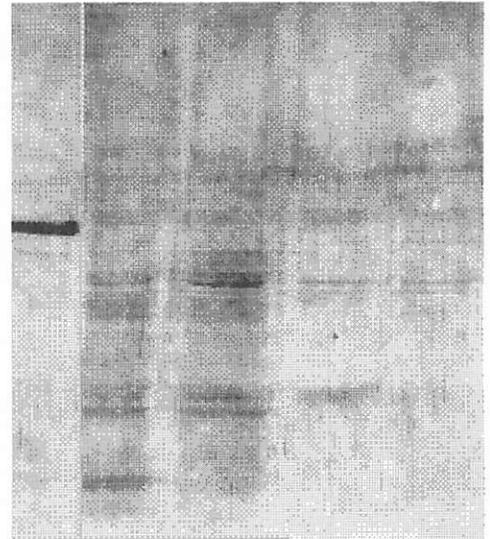
0 1 2 3 4

*Echinochloa pyramidalis*

0 1 2 3 4

*Brachiaria mutica*

0 1 2 3 4

*Digitaria suazilandensis*

ADH 0 1 2 3 4

DIAS EM ANOXIA

FIGURA 7. Variação no padrão eletroforético de proteínas de folhas em anoxia.

## 5 CONCLUSÕES

- Em todas as espécies estudadas as respostas metabólicas foram mais pronunciadas na parte aérea do que nas raízes.
- *P. acuminatum* foi a espécie que apresentou estratégias de tolerância mais eficientes, mantendo o metabolismo anaeróbico num nível suficiente para o crescimento durante a anoxia, o vigor e a sobrevivência pós-anaerobiose.
- Em *E. polystachia* tanto a atividade das enzimas quanto o teor de proteínas decresceram com a imposição do tratamento, contudo seu crescimento não diferiu entre os tratamentos, utilizando suas reservas durante o período prolongado em anoxia, anulando seu vigor e sobrevivência pós-anoxia.
- A atividade das enzimas e o teor de proteínas em *E. pyramidalis* decresceu com o período em déficit de oxigênio, contudo o baixo crescimento e a alta síntese de proteínas no final do período experimental podem ter propiciado a manutenção de um vigor satisfatório e a sobrevivência ao retornar à aeração normal.
- Em *B. mutica* observou-se em anaerobiose um ajuste do metabolismo para as vias fermentativas, propiciando o sucesso desta espécie durante o período em anoxia e sua sobrevivência pós anoxia.
- *M. minutiflora* e *D. suazilandensis* confirmaram sua sensibilidade ao estresse anaeróbico tanto pelo decréscimo no teor de proteínas e na atividade das enzimas álcool desidrogenase e lactato

desidrogenase, quanto pela paralisação ou redução do crescimento e comprometimento do vigor e sobrevivência pós anoxia.

- O padrão eletroforético das proteínas apresentou variações desde o primeiro dia de tratamento anóxico, com a repressão de várias proteínas e indução de outras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, D.L.; COBB, B.G.; JOHNSON, J.R.; DREW, M.C. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.407-414, 1993.
- ANDREWS, D.L.; DREW, M.C.; JOHNSON, J.R.; COBB, B.G. The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.53-60, 1994a.
- ANDREWS, D.L.; MacALPINE, D.M.; JOHNSON, J.R.; KELLEY, P.M.; COBB, B.G.; DREW, M.C. Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, p.1575-1582, 1994b.
- ALBRECHT, G.; WIEDENROTH, E-M. Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of glutathione system. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, n.273, p.449-455, 1994.
- ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M.B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p. 307-358, 1994.
- BAILEY-SERRES, J.; KLOECKENER-GRUISSEM,B.; FREELING,M. Genetic and molecular approaches to the study of the anaerobic response and tissue specific gene expression in maize. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.11, p.351-357, 1988.
- BERTANI, A.; BRAMBILLA, I.; MENEGUS, F, Effect of anaerobiosis on rice seedlings: Growth, metabolic rate and fate of fermentation products. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.31, n.120, p.325-331, 1980.
- BETSCHKE, T. l-Lactate dehydrogenase from leaves of higher plants. Occurrence and metabolism of lactate under aerobic conditions. **Phytochemistry**, Elmsford, v.22, n.6, p.1341-1344, 1983.
- BOLLAG, D.M.; EDELSTEIN, S.J. **Protein Methods**, New York: Willey-Lis Inc., 1991. 230p.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- BUCHER, M.; KUHLEMEIER, C. Long term anoxia tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.441-448, 1993.
- COBB, B.G.; KENNEDY, R.A. Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oryza sativa*) and *Echinochloa* seedlings. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.10, p.633-638, 1987.
- COUÉE, I.; De FONTAINE, S.; CARDE, J-P.; PRADET, A. Effects of anoxia on mitochondrial biogenesis in rice shoots. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, p.411-421, 1992.
- CRAWFORD, R.M.M. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Advances in Ecological Research**, London, v.23, p. 93-185, 1992.
- DAVIES, D.D. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: DAVIES, D.D. (ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980. v.2, p.581-611.
- DAVIES, D.D.; GREGO, S.; KENWORTHY, P. The control of lactate and ethanol by higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, n.4, p.297-310, 1978.
- DREW, M.C.; SAGLIO, P.H.; PRADET, A. Larger adenylate energy charge and ATP/ADP ratios in aerenchymatous roots of *Zea mays* in anaerobic media as a consequence of improved internal oxygen transport. **Planta**, New York, v.165, p.51-58, 1985.
- DREW, M.C.; STOLZY, L.H. Growth under oxygen stress. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, V. **Plant Roots: The hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 331-350.
- FOX, T.C.; KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E. Energetics of plant growth under anoxia: Metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phyllopogon*. **Annals of Botany**, London, v.74, p.445-455, 1994.
- FREELING, M.; BENNETT, D.C. Maize *Adh1*. **Annual Review of Genetic**, Palo Alto, v.19, p.297-323, 1985.
- HANSON, A.D.; JACOBSEN, J.V. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and  $\alpha$ -amylase by O<sub>2</sub> deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, Rockville, v.75, p.566-572, 1984.
- HOFFMAN, N.E.; BENT, A.F.; HANSON, A.D. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.658-663, 1986.
- HOFFMAN, N.E.; HANSON, A.D. Purification and properties of hypoxically induced lactate dehydrogenase from barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.664-670, 1986.

- HOLE, D.J.; COBB, B.G.; HOLE, P.S.; DREW, M.C. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low-oxygen (hypoxic) acclimation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p.213-218, 1992.
- JOHNSON, J.R.; COBB, B.G.; DREW, M.C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* null *Zea mays* L.. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.61-67, 1994.
- KELLEY, P.M.; FREELING, M. Anaerobic expression of maize fructose-1,6-diphosphate aldolase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.259, n.22, p.14180-14183, 1984.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1-6, 1992.
- KIMMERER, T.W. Alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase activity in leaves and roots of eastern cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) and soybean (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v.84, p.1210-1213, 1987.
- KIMMERER, T.W.; MacDONALD, R.C. Acetaldehyde and ethanol biosynthesis in leaves of plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.84, p.1204-1209, 1987.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LAZLO, A.; LAWRENCE, P.S. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Molecular and General Genetics**, New York, v.192, p.110-117, 1983.
- LEMKE-KEYES, C.A.; SACHS, M.M. Anaerobic tolerant null: mutant that allows *Adh1* nulls to survive anaerobic treatment. **Journal of Heredity**, Washington, v.80, p.316-319, 1989.
- MALTBY, E. Wetlands- their status and role in biosphere. In: JACKSON, M.B.; DAVIES, D.D.; LAMBERS, H. **Plant life under oxygen stress**. The Netherlands: SPB Academic Publishing, 1991, p. 3-21.
- MIERNYK, J.A. Glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In: DENNIS, D.T.; TURPIN, D.H. **Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. London: Logman Scientific & Technical, 1990. p.77-100.
- MOCQUOT, B.; PRAT, C.; MOUCHES, C.; PRADET, A. Effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryo. **Plant Physiology**, Rockville, v.69, p.636-640, 1981.
- MONK, L.S.; FARGESTED, K.V.; CRAWFORD, R.M.M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide., **Plant Physiology**, Rockville, v.85, p.1016-1020, 1987.
- MUJER, C.V.; RUMPHO, M.E.; LIN, J.; KENNEDY, R.A. Constitutive and inducible aerobic and anaerobic stress proteins in the *Echinochloa* complex and rice. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.217-226, 1993.

- NETO, M.A.M.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M. Anaerobic metabolism of *Euterpe oleracea*. I- Alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and seed embryo development. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.7, n.1, p.41-45, 1995a.
- NETO, M.A.M.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M. Anaerobic metabolism of *Euterpe oleracea*. II- Plant tolerance mechanism to anoxia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.7, n.1, p.47-51, 1995b.
- NEWMAN, K.D.; VAN TOAI, T.T. Developmental regulation and organ-specific expression of soybean alcohol dehydrogenase. **Crop Science**, Madison, v.31, p.1253-1257, 1991.
- NEWMAN, K.D.; VAN TOAI, T.T. Molecular characterization of the soybean alcohol dehydrogenase gene family amplified in vitro by the polymerase chain reaction. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.489-495, 1992.
- OKIMOTO, R.; SACHS, M.M.; PORTER, E.K.; FREELING, M. Patterns of polypeptide synthesis in various maize organs under anaerobiosis. **Planta**, New York, v.150, p.89-94, 1980.
- OLIVEIRA, L.E.M. **Crescimento e comportamento nutricional de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) submetidas a níveis de alumínio**. Viçosa: UFV, 1979. 50p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- OLIVEIRA, P.C. **Avaliação de gramíneas cultivadas em três níveis de fertilidade de solo, visando a revegetação de áreas sujeitas à inundação**. Lavras: ESAL, 1994. 88p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PELACANI, C.R. **Estratégias de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular**. Lavras: ESAL, 1993. 109p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- PIEDADE, M.T.F. **Biomassa, produtividade e atividade fotossintética de *Echinochloa polystachia* (H.B.K.) Hitchcock (Gramineae = Poaceae), capim semi-aquático da várzea amazônica**. Manaus: INPA, 1988. 154p. (Tese - Doutorado em Ecologia).
- RIVOAL, J.; HANSON, A.D. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the Halophytic genus *Limonium*. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.553-560, 1993.
- RIVOAL, J.; HANSON, A.D. Metabolic control of anaerobic glycolysis. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, p.1179-1185, 1994.
- RUSSEL, D.A.; SACHS, M.M. Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, p.615-620, 1992.

- SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v.161, p.111-115, 1978.
- SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, Cambridge, v.20, p.761-767, 1980.
- SACHS, M.M.; HO, T.-H.D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annual review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.363-376, 1986.
- SAGLIO, P.H.; RAYMOND, P.; PRADET, A. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1053-1057, 1980.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.
- SETTER, T.L.; ELLA, E.S. Relationship between coleoptile elongation and alcoholic fermentation in rice exposed to anoxia. I. Importance of treatment conditions and different tissues. **Annals of Botany**, London, v.74, p.265-271, 1994.
- UMEDA, M.; UCHIMIYA, H. Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oryza sativa* L.) under submergence stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.106, p.1015-1022, 1994.
- VANDER ZEE, D.; KENNEDY, R.A. Germination and seedling growth in *Echinochloa crus-galli* var. *Oryzicola* under anoxic conditions: structural aspects. **American Journal of Botany**, Columbus, v.68, n.9, p.1269-1277, 1981.
- WALKER, J.M. **Methods in Molecular Biology. Volume 1: Proteins**. New Jersey: Humana Press, 1984. 365p.
- WIGNARAJAH, K.; GREENWAY, H. Effect of anaerobiosis on activities of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in roots of *Zea mays*. **New Phytologist**, Cambridge, v.77, p.575-584, 1976.
- XIA, J.-H.; ROBERTS, J.K.M. Improved cytoplasmic regulation, increased lactate efflux, and reduced cytoplasmic lactate levels are biochemical traits expressed in root tips of whole maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.651-657, 1994.
- XIA, J.-H.; SAGLIO, P.H. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation maize root tips to anoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.40-46, 1992.
- ZHANG, F.; LIN, J.-J.; FOX, T.C.; MUJER, C.V.; RUMPHO, M.E.; KENNEDY, R.A. Effect of aerobic priming on the response of *Echinochloa crus-gavonis* to anaerobic stress. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, p.1149-1157, 1994.