

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E BIOQUÍMICA DE
SEMENTES DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea* Mart.)
DURANTE A GERMINAÇÃO EM CONDIÇÕES DE ANOXIA
E NORMOXIA**

MARCO ANTÔNIO MENEZES NETO

2004

MARCO ANTÔNIO MENEZES NETO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E BIOQUÍMICA
DE SEMENTES DE AÇAIZEIRO (*Euterpe oleracea*
Mart.) DURANTE A GERMINAÇÃO EM
CONDIÇÕES DE ANOXIA E NORMOXIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".



Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Neto, Marco Antônio Menezes

**Caracterização anatômica e bioquímica de sementes de açaizeiro
(*Euterpe oleracea* Mart.) durante a germinação em condições de
anoxia e normoxia / Marco Antônio Menezes Neto. – Lavras:
UFLA, 2004.**

74 p.

**Orientador: José Donizeti Alves
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.**

**1. Euterpe oleracea. 2. Palmeira. 3. Anaerobiose. 4. Anatomia. 5.
Açaizeiro. 6. α -amilase. 7. endo- β -mananase. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.**

CDD-634.9745

MARCO ANTÔNIO MENEZES NETO

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E
BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE AÇAIZEIRO
(*Euterpe oleracea* Mart.) DURANTE A
GERMINAÇÃO EM CONDIÇÕES DE ANOXIA E
NORMOXIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

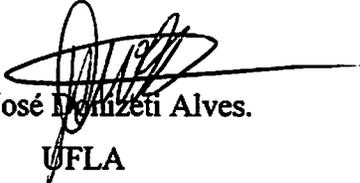
APROVADA em 29 de dezembro de 2004

Dra. Patrícia de F. P. Goulart UFLA

Dr. Nelson Delu Filho UFLA

Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva UFLA

Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA


Prof. José Denizeti Alves.

UFLA

(Orientador)

A toda minha família e aos amigos do Pará,

OFEREÇO.

Aos meus pais, Juracy Sá Neto e Ruth Menezes Neto.

Aos meus irmãos, Marcus Vinícius e Márcia (manatota).

À minha amada esposa, Rejane.

A meus amados filhos, Mateus e João Marcos.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e aos meus irmãos, por todo amor e encorajamento e por suportarem, junto comigo, a distância e a enorme saudade.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), pela licença concedida para a realização do doutorado.

Ao meu orientador, professor José Donizeti Alves e sua esposa Patrícia Goulart, por toda atenção, apoio, amizade e conselhos oferecidos durante estes dois anos de convívio profissional.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Patrícia Goulart, Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva, Dr. Nelson Delu Filho e Dr. Evaristo Mauro de Castro.

Aos professores: Ângela, Marcelo, Donizeti, Amauri, Evaristo, Custódio, Renato, Luciano e Luiz Edson, por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao amigo Marcelo Murad, pela convivência e apoio.

Aos funcionários técnico-administrativos: Evaristo, D'Artagnan e Izonel, por todo auxílio dado e a Lena, ao Joel e ao Odorêncio, pela simpatia sempre constante.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, em especial: Breno, Cristiano, Ednabel, Marilza, Andréa Shan, Dani (gaúcha), Anne, Dani (mineira), Sílvia, Cláudia, Inês, Érico, Guto, Aurélio, Hyrandir, João Paulo, Cristina, Grécia, Morbeck, Peterson, Lenaldo, Lisandro, Teresa,

Sidnei, Girlene e Ivana, por tornarem os meus dias de trabalho mais felizes.

Ao grande amigo Paulo Cairo, por ser um exemplo de professor, amigo e por seu equilíbrio e retidão em todas as atividades desenvolvidas durante o curso.

Às porcarias paraenses: Louise e Raírys, pelo carinho e apoio.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, por todo o auxílio prestado na busca de referências bibliográficas.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	2
2.1 Descrição da espécie.....	2
2.2 Classificação botânica.....	3
2.3 Importância econômica.....	3
2.4 Anatomia de palmeiras.....	4
2.5 O estresse anóxico.....	7
3 Material e métodos.....	12
3.1 Simulação da anoxia.....	12
3.2 Curva de embebição.....	13
3.3 Interconversão de matéria seca entre endosperma e plântula durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula de açaí.....	13
3.4 Estudo anatômico de sementes e plântulas de açaizeiro e determinação dos tecidos de acúmulo de amido.....	14
3.5 Observação de células isoladas do endosperma e haustório de plântulas de açaizeiro.....	16
3.6 Análise ultra-estrutural das células do endosperma de sementes.....	16
3.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	17
3.8 Influência das reservas da semente sobre a sobrevivência de plântulas de açaizeiro à anoxia.....	18
3.9 Determinação do período máximo de tolerância de sementes de açaizeiro a anoxia.....	18
3.10 Determinação do teor de amido em sementes.....	19

3.11 Avaliação qualitativa <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da atividade amilolítica em sementes e plântulas de açaizeiro.....	19
3.12 Focalização isoeétrica de enzimas amilolíticas.....	21
3.13 Avaliação qualitativa da atividade da enzima endo- β -mananase.....	21
3.13.1 Preparo do extrato.....	21
3.13.2 Preparo do gel.....	26
3.13.3 Aplicação do extrato e revelação do gel.....	22
3.14 "Tissue printing" de endo- β -mananase.....	23
3.15 Determinação do teor de água das sementes de açaizeiro.....	23
4 Resultados e discussão.....	24
4.1 Curva de embebição.....	24
4.2 Interconversão de matéria seca entre endosperma e embrião, durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula de açaizeiro.....	25
4.3 Estudo anatômico de sementes e plântulas de açaizeiro.....	27
4.4 Tolerância de sementes de açaizeiro a anoxia.....	42
4.5 Efeito da anoxia sobre o consumo de amido do haustório de plântulas de açaizeiro.....	44
4.6 Efeito das reservas das sementes sobre a sobrevivência de plântulas de açaizeiro pós-anoxia.....	46
4.7 Avaliação qualitativa da atividade amilolítica em sementes e plântulas de açaizeiro.....	47
4.8 Atividade de endo- β -mananase durante o processo de embebição de sementes.....	58
4.9 A estratégia de sobrevivência do açaizeiro ao estresse anóxico.....	61
5 Conclusões.....	63
6 Referências bibliográficas.....	64

RESUMO

NETO, Marco Antônio Menezes. **Caracterização anatômica e bioquímica de sementes de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) durante a germinação em condições de anoxia e normoxia.** 2004. 74 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira de grande importância econômica que predomina no estuário do Rio Amazonas, principalmente em solos de várzea, onde ocorrem inundações periódicas. Apesar de sua importância e de sua inquestionável tolerância a condições de baixa disponibilidade de oxigênio, sabe-se muito pouco a respeito de suas estratégias de tolerância à hipoxia e/ou anoxia. O objetivo desse trabalho foi caracterizar anatomicamente sementes e plântulas de açazeiro, gerando informações cruciais para o estudo do processo de degradação das reservas de sementes e plântulas, durante a anaerobiose. Os resultados da caracterização anatômica demonstraram que: as sementes de açazeiro são ruminadas (testa ruminada); seu endosperma é formado por células de diversos tamanhos e formas, com paredes espessas e muitas pontuações; seu embrião é formado por eixo hopocótilo-radicular, procâmbio e parênquima com numerosos idioblastos com ráfides e o endosperma da semente, a base do caulículo e o haustório são os locais de acúmulo de amido. Após submeter sementes e plântulas a diferentes tempos de anoxia, pôde-se concluir que: as sementes de açazeiro podem tolerar até quatro meses de anoxia, germinando após transferência para condições normóxicas; a tolerância de sementes e plântulas está relacionada com a manutenção da atividade amilolítica; a enzima α -amilase é pré-existente em sementes de açazeiro; a enzima endo- β -mananase não é sintetizada em sementes durante a anoxia; a enzima endo- β -mananase é sintetizada *de novo* em sementes; o haustório é o sítio inicial de síntese da endo- β -mananase em sementes de açazeiro germinadas em condições normóxicas.

* Comitê Orientador: José Donizeti Alves - UFLA (Orientador), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva (co-orientador), Patrícia de Fátima Pereira Goulart (co-orientadora).

ABSTRACT

NETO, Marco Antônio Menezes. **Anatomical and biochemical characterization of açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds during germination in conditions of anoxia and normoxia.** 2004. 74 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) is palmaceae of the great economical importance that is very common in Amazonas river, mainly in low and flat land alongside a water course, where is common the intermitent inundations. In spite of its importance and high tolerance to low availability oxygen conditions, its strategies to tolerate hypoxia and /or anoxia are unknown. The objective of this paper was to characterize the anatomical aspects of seeds and plantlets of açazeiro, giving informations to study plantlet and seed reserve degradation, during anaerobiosis. The results of anatomical characterization showed that the seeds of "açazeiro" are ruminated (ruminated front), its endosperm is formed by cells from different sizes and shapes, with thick walls and very pontuaction, its embryo is formed by root-hypocotil axis, procambium and parenchym with various idioblasts with rafids and that the endosperm of seed, the basis of shoot and haustory are the place for starch accumulation. After submit the seeds and plantlets to different times of anoxia, it is possible to conclude that the "açazeiro" seeds could stand until four months of anoxia, germinating after the transference for normoxic conditions, the tolerance of seeds and plantlets are related to maintenance of amyloitic activity the enzyme α -amylase is pré-existing in seeds of açazeiro, the enzyme endo β -mananase is not synthetized in seeds during the anoxia, the enzyme endo β -mananase is synthetized "de novo" in seeds, the haustory is a initial synthesis site of endo β -mananase in seeds of açazeiro germinated in normoxic conditions.

* Guidance Committee: José Donizeti Alves - UFLA (Adviser), Edvaldo Aparecido Amaral da Silva - UFLA (Co-adviser), Patrícia de Fátima Pereira Goulart - UNILAVRAS (co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), também conhecido por açai e jussara, pode ser considerada a espécie mais importante do gênero *Euterpe*, dentre as dez registradas no Brasil e as sete que ocorrem na Amazônia. É encontrado em toda a bacia amazônica, sendo particularmente abundante em sua parte oriental (Corrêa, 1926; Glassman, 1972).

No estado do Pará, o açazeiro predomina no estuário do rio Amazonas, principalmente em solos de várzea, onde ocorrem inundações periódicas, por influência das marés, ou sazonais (Lima & Tourinho, 1996). Nestas áreas ocorrem espécies vegetais altamente adaptadas e que apresentam tolerância à submersão (Prance, 1980; Ayres, 1993; Amaral; Adis & Prance, 1997). Dentre estas espécies, destaca-se o açazeiro, com fortes evidências de que possui algum mecanismo de tolerância ao alagamento e/ou anoxia.

Neto Alves & Oliveira (1995 A) demonstraram que sementes e plântulas de açazeiro, submetidas a diferentes tempos de anoxia, apresentam os metabolismos anaeróbicos láctico e etanólico ativos. Esta observação evidencia que sua tolerância está relacionada com a manutenção do fluxo glicolítico e que as enzimas estudadas (desidrogenases do etanol e lactato) podem ser constitutivas, pois não houve diferença entre os tratamentos aerado e anóxico. Adicionalmente, notaram que as sementes de açazeiro foram capazes de suportar vinte dias de anoxia, caracterizando a manutenção do processo degradativo das reservas da semente.

Alguns trabalhos demonstram que um elevado suprimento de carboidratos contribui para a sobrevivência de sementes sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio e que há relação entre a indução da α -amilase e a tolerância à anoxia (Perata et al., 1992; Perata & Alpi, 1993). Entretanto, até o momento, não se sabe o motivo pelo qual sementes e plântulas de açazeiro

tolerarem vários dias de anoxia e, principalmente, quais as reservas utilizadas pelo mesmo para manter o metabolismo anaeróbico ativo.

Diante do exposto, objetivou-se caracterizar anatomicamente e estudar o metabolismo degradativo das reservas de sementes e plântulas de açazeiro durante períodos de anoxia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

É uma palmeira multicaule, com até 25 estipes por touceira. Os estipes, nos indivíduos adultos, apresentam altura e diâmetro variando entre 3m e 20m e entre 7cm e 18cm, respectivamente. Cada estipe sustenta, em sua porção terminal, um conjunto de 8 a 14 folhas compostas, pinadas e de arranjo espiralado, com 40 a 80 pares de folíolos, opostos ou subopostos.

A inflorescência do açazeiro é infrafoliar e disposta quase horizontalmente. Nos dois primeiros terços de cada ráquila, as flores estão dispostas em tríades com cada flor feminina ladeada por duas flores masculinas. No terço terminal das ráquulas encontram-se, normalmente, somente flores masculinas. As inflorescências apresentam, em média, 80,5% de flores masculinas e 19,5% de flores femininas.

O fruto do açazeiro é uma drupa globosa, apresentando resíduos florais, com diâmetro variando entre 1cm e 2cm e peso médio de 1,5g. O epicarpo, nos frutos maduros, apresenta coloração arroxeada quase preta ou verde, dependendo do tipo. O mesocarpo é polposo e delgado, com espessura quase sempre igual ou inferior a 1mm e envolve o volumoso e duro endocarpo, o qual contém em seu interior uma semente, com embrião diminuto e abundante endosperma ruminado.

2.2 Classificação botânica

Divisão: *Magnoliophyta* (= Angiosperma); Classe: *Liliopsida* (= Principes); Subclasse: *Arecoideae*; Ordem: *Arecales*; Família *Areceaceae* (= Palmae); Subfamília: *Arecoideae*; Gênero: *Euterpe*; Espécie: *Euterpe oleracea*

2.3 Importância econômica

O açaizeiro é uma das palmeiras mais típicas da Amazônia e apresenta uma multiplicidade de usos. Seu principal produto é obtido pelo despulpamento de seus frutos, produzindo o famoso açaí, bebida de consistência pastosa, muito utilizada na alimentação popular e elaboração de sucos, picolés e sorvetes. Nos últimos anos, diversas formas de apresentação do produto têm surgido no mercado, tais como: o açaí pasteurizado, o açaí com xarope de guaraná, o açaí em pó, o iogurte, o doce de leite com açaí, a geléia e o licor de açaí. Atualmente, parte da produção do suco de açaí vem sendo exportada para os estados do Sul/Sudeste do Brasil, bem como para o Nordeste e, mais recentemente, para os Estados Unidos.

O palmito, outro importante produto derivado do açaizeiro é usado no preparo de picles, saladas, cremes e ração animal. De todo o palmito produzido no Brasil, 95% provêm do açaizeiro. Recentemente, algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas para o aproveitamento da vassoura (cacho) do açaí e da haste que envolve o palmito, como matéria-prima para a confecção de papel artesanal. O caroço da fruta é aproveitado como adubo orgânico e ração para animais. Além das possibilidades de utilização anteriormente citadas, algumas indústrias de perfume têm demonstrado grande interesse em produzir fragrâncias com essências da fruta do açaizeiro.

O açaizeiro vem se destacando como uma espécie promissora no agronegócio e como fonte de renda para pequenos agricultores, que podem produzir como integrados das agroindústrias de processamento de açaí, principalmente na região norte do estado do Pará.

2.4 Anatomia de palmeiras

Alguns trabalhos relacionados com palmeiras foram produzidos na década de 1990, abordando várias temáticas da botânica (Henderson et al., 1991; Henderson & Scariot, 1993; Moussa et al., 1994; Jardim, 1996; Mesquita & Jardim, 1996; Storti, 1993; Jardim & Macambira, 1996; Kùchmeister et al., 1998; McCurrach, 1960; Khan & Granville, 1992; Rabelo, 1997), e suas diversas possibilidades de uso (Khan & Granville, 1992; Simpson & Ogorzaly, 1995; Heywood, 1993).

Medina (1959) destaca as palmeiras como um grupo muito importante dentre as plantas produtoras de fibras e Oliveira (1991), em levantamento feito na região amazônica, ressalta as características anatômicas que algumas palmeiras possuem e que favorecem a obtenção e o beneficiamento de suas fibras. Entretanto, são escassos os trabalhos sobre anatomia de palmeiras, principalmente quando referentes a órgãos reprodutivos, como sementes.

Tomlinson (1961) fez um estudo descrevendo a anatomia dos órgãos vegetativos de algumas palmeiras. O mesmo autor, em 1990, descreveu o fruto das palmeiras como uma baga ou drupa fibrosa, possuindo uma ou mais sementes com mesocarpo fibroso e com formato, na maioria dos casos, esférico. Destacou, como características morfológicas constante dos frutos, o endosperma abundante e o embrião de pequena dimensão, em relação ao endosperma. Uhl & Dransfeld (1987) descreveram a morfologia geral do fruto das palmeiras.

Recentemente, Essig (1999) descreveu as principais características anatômicas do pericarpo do fruto de diversas palmeiras, classificando os diferentes tecidos e estruturas que os compõem.

As sementes das palmeiras são geralmente arredondadas, podendo ser oblongas, achatadas ou mesmo cônicas e, menos frequentemente, curvadas. Pinheiro (1986) afirma que o embrião pode ser basal, se está situado próximo à micrópila ou no ponto de inserção da semente; apical, se situado no lado contrário, ou lateral. Dentre os raros trabalhos sobre anatomia de sementes de palmeiras, podem-se destacar os trabalhos de Aguiar (1998), descrevendo a anatomia da semente de *Euterpe precatoria* e o de De Paula (1975), que descreve a anatomia de *Euterpe oleracea* Mart..

Alguns trabalhos abordam o processo de degradação e a composição química do endosperma das sementes de palmeiras, sendo os aspectos anatômicos pouco explorados (Takeuchi, 1961; Alang et al., 1988; Sugimura & Murakami, 1990). Dassanayake & Sivakachchan (1973) verificaram que o endosperma de *Borassus flabellifer* L. consiste de duas regiões, uma periférica e outra central, que apresentam características diferenciais, como, por exemplo, o tamanho e a disposição das células.

Outros estudos anatômicos foram feitos a fim de elucidar questões relacionadas com a embriogênese e germinação de sementes de palmeiras (Dassanayake & Sivakadachchan, 1973; DeMason & Thomson, 1981; Haccius & Kelara, 1979; Teixeira et al., 1993). Mais recentemente, Menezes (2000) descreveu aspectos morfo-anatômicos do fruto e da semente de *Socratea exorrhiza*, detalhando as camadas do pericarpo e a anatomia do embrião.

Algumas sementes de monocotiledôneas podem apresentar células do endosperma vivas. DeMason et al. (1983) afirmaram que as células do endosperma de *Phoenix dactilifera* são vivas.

As células do endosperma podem formar grandes reservas na forma de polissacarídeos de parede. A constituição química desses polissacarídeos pode variar consideravelmente entre taxa (Meier & Reid, 1982). As paredes espessadas das células do endosperma de todas as palmeiras investigadas por Meier & Reid (1982) e Mayer & Polijakoff-Mayber (1989), consistiam de pura manana. A manana é um polissacarídeo que se caracteriza pela quase ausência de ramificações, dureza e insolubilidade em água.

DeMason et al. (1989) sugerem que as paredes endospérmicas de *Phoenix dactilifera* são formadas, inicialmente, pela deposição de galactomananas e que, durante o processo de desenvolvimento da semente, as ramificações de galactose são clivadas, dando origem a paredes de pura manana.

Outra característica interessante das sementes de palmeiras é que algumas podem ser ruminadas. Bayer & Appel (1996) afirmam que uma semente pode ser ruminada em decorrência da existência de um endosperma ou do próprio tegumento irregular. O último caso pode ocorrer em algumas palmeiras, cujo tegumento desenvolve-se irregularmente dentro do endosperma, antes do endurecimento do mesmo (Corner, 1966).

Não há definição se a ruminação do endosperma ou do tegumento da semente proporciona alguma vantagem durante o desenvolvimento e/ou germinação da semente. Contudo, Boesewinkel & Bouman (1984) sugerem que a ruminação pode aumentar a superfície de contato entre a testa e o endosperma, permitindo um aumento da absorção de água e nutrientes pela testa.

Nesse sentido, é importante ressaltar a importância dos estudos anatômicos na geração de informações que ajudem o entendimento de processos fisiológicos relativos à germinação de sementes.

2.5 O estresse anóxico

Diversas são as condições ambientais que podem proporcionar o alagamento do solo, gerando condições de hipoxia ou anoxia, dentre as quais se destacam: irrigação em solos mal drenados, inundações e elevação do nível de reservatórios hidrelétricos. Após o alagamento do solo, as raízes das plantas podem experimentar uma deficiência de O_2 em decorrência da lenta difusão do mesmo através dos espaços porosos do solo, por estarem cheios de água (Drew & Lynch, 1980; Drew, 1992). Quando, em um solo alagado, a respiração dos microorganismos é estimulada, ocorre, em menos de 24 horas, uma queda abrupta nos níveis de O_2 do solo, provocando a transição de um ambiente aerado a um anóxico (Erdmann & Wiedenroth, 1988; Good & Paetkau, 1992).

As plantas são organismos aeróbicos obrigatórios, entretanto, podem tolerar condições anaeróbicas por períodos de tempo variáveis, dependendo da espécie, mas, geralmente, não crescem sob anoxia (ausência de O_2). Contudo, coleóptiles de arroz (*Oryza sativa*) e arroz selvagem (*Zizania aquatica*) possuem uma capacidade limitada de crescerem sob condições estritamente anaeróbicas. O crescimento observado nessas espécies parece estar relacionado, principalmente, com a expansão celular, mas evidências (Öpik, 1973; Mocquot et al., 1981) demonstram que pode ocorrer alguma divisão celular nas espécies e condições citadas.

As plantas adotam diversas estratégias para tolerarem a diminuição ou ausência de O_2 no solo. Estratégias morfo-anatômicas, como formação de aerênquimas (He, Drew & Morgan, 1994), lenticelas (Tang & Kozlowski, 1984; Siebel, Vanwijk & Blom, 1998; Crawford & James, 1998) e raízes adventícias (Pezeshki, 1996; Osundina, 1998), são importantes como mecanismos de escape à ausência de O_2 , em casos de alagamento. Já as estratégias metabólicas permitem que as plantas suportem a ausência de oxigênio. Nesta condição

(anoxia), as estratégias de escape não têm nenhum efeito, contudo, as plantas tolerantes ao alagamento e/ou anoxia parecem ser capazes de desenvolverem ambas as estratégias de tolerância.

Sob condições normais de oxigênio (normoxia), as plantas oxidam 1 mol de hexose, pro meio da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT) e da cadeia de transporte de elétrons (CTE), produzindo de 30 a 32 moles de ATP (Taiz & Zeiger, 2004). Na ausência de O_2 – o aceptor final de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial –, essa produção cai a dois moles. Com isso, a razão ATP/ADP diminui, pois a CTE pára de oxidar o NADH formado no CAT e acumula-o na mitocôndria, provocando a inibição do mesmo. O piruvato, que antes era oxidado no CAT passa a ser substrato para as vias anaeróbicas - principalmente etanólica e láctica. Essas vias são importantes por permitirem a reciclagem do NAD^+ e produção de, pelo menos, dois moles de ATP/mol de hexose, no citossol.

Tudo indica que a tolerância à anoxia que algumas plantas possuem está relacionada à rota glicolítica. Sob condições anaeróbicas, ocorrem mudanças nos níveis de intermediários glicolíticos em tecidos vegetais e um aumento do fluxo glicolítico, o conhecido efeito Pasteur. O aumento do fluxo glicolítico é indispensável, durante a anaerobiose, pois possibilita o aumento da síntese de ATP, na unidade de tempo, quando comparada com a síntese glicolítica de ATP em condições aeróbicas. A via glicolítica ocorre tanto em condições aeróbicas quanto em condições anaeróbicas. A suplementação de glicose exógena, em raízes destacadas, promoveu um aumento da taxa fermentativa e do metabolismo energético (Hole et al., 1992; Saglio, Raymond & Pradet, 1980; Waters et al., 1991a) e, algumas vezes, aumentou o tempo de sobrevivência de raízes inteiras (Waters et al., 1991b; Webb & Armstrong, 1983) ou manteve a estrutura mitocondrial sem alterações irreversíveis (Vartapetian et al., 1977). Assim, um

suprimento de açúcares prontamente respirável pode, em alguns casos, aumentar a sobrevivência em condições anóxicas.

A falta de oxigênio, mesmo que por pequenos períodos de tempo, pode promover o efeito Pasteur em algumas plantas. Isto não significa que a espécie que o apresenta será tolerante à anoxia, pois muitas plantas intolerantes apresentam um efeito Pasteur pronunciado (Bewley & Black, 1978). *Erythina caffra*, uma espécie tolerante, também apresenta, entretanto, *Echinochloa phyllopogon* e arroz não (Kennedy et al., 1980).

Em virtude das plantas tolerarem a anoxia por pelo menos algumas horas, a distinção entre plantas tolerantes e intolerantes é relativa. Entretanto, ela é evidente em se tratando de espécies originárias de regiões alagadas, que possuem um metabolismo especializado que permite às mesmas tolerarem períodos prolongados de anoxia. Estudos têm demonstrado que rizomas e folhas de *Scheonoplectus lacustris*, *Scirpus maritimus* e *Typha angustifolia* (Armstrong, Brändle & Jackson, 1994; Barclay & Crawford, 1982); ramos e tubérculos da monocotiledônea aquática *Potamogeton pectinatus* (Summers & Jackson, 1996) e da monocotiledônea anfíbia *Acorus calamus* (Bucher & Kuhlemeier, 1993) são capazes de tolerarem de semanas a meses de anoxia.

A base metabólica de tolerância à anoxia deve envolver a manutenção da glicólise para a produção de ATP, regeneração de NAD^+ a partir do NADH, para que a glicólise não seja paralisada, e a produção de metabólitos finais que sejam inócuos ou que rapidamente sejam transferidos para o meio externo. O NAD^+ é requerido para a conversão do 3-fosfogliceraldeído a 1,3-fosfoglicerato, na glicólise. Esta reação é catalisada pela desidrogenase do fosfogliceraldeído, utilizando o NAD^+ regenerado, tanto por meio da rota fermentativa etanólica como láctica. Órgãos tolerantes a anoxia, de espécies de regiões alagadas, apresentam características como: fermentação etanólica predominante (Armstrong, Brändle & Jackson, 1994; Bertani, Brambilla & Menegus, 1980;

Bucher & Kuhlemeier, 1993; Duss & Brändle, 1982); liberação do etanol para o meio externo (Bertani, Brambilla & Menegus, 1980; Duss & Brändle, 1982; Monk, Crawford & Brändle, 1984) e presença de reservas de carboidratos para manter a glicólise e o metabolismo energético (Armstrong, Brändle & Jackson, 1994; Bertani, Brambilla & Menegus, 1980; Guglielminetti, Perata & Alpi, 1995; Hanhijärvi & Fagerstedt, 1995; Steinmann & Brändle, 1984). Em alguns casos, uma alta atividade de fosforilases do amido permite a produção de mais um mol de ATP por mol de glicose oxidada (Hanhijärvi & Fagerstedt, 1995; Steinmann & Brändle, 1984).

Todas as plantas são capazes de sobreviver durante pequenos períodos de anoxia (de minutos a algumas horas). Entretanto, em células que são metabolicamente ativas, o conteúdo de ATP é suficiente por apenas 1-2 minutos (Roberts et al., 1984a; Roberts et al., 1984b). O metabolismo anaeróbico deve manter os níveis de ATP celulares compatíveis com a manutenção da organização celular, caso contrário, ocorrerá a morte celular.

De maneira geral, sementes de cereais não germinam sob anoxia, mas arroz representa uma exceção a essa regra (Alpi & Beevers, 1983; Perata & Alpi, 1993). Ao comparar as estratégias moleculares e metabólicas de tolerância à anoxia que o arroz utiliza com as utilizadas por outros cereais, constata-se que faltam muitas respostas e que existem algumas lacunas a serem preenchidas. Entretanto, sabe-se que é essencial a qualquer espécie manter o metabolismo fermentativo ativo e capaz de produzir níveis elevados de ATP (Drew, 1990; Kennedy, Rumpho & Fox, 1992; Perata & Alpi, 1993). Para isso, é importante que a espécie tenha uma reserva de carboidratos disponível, para manter o metabolismo fermentativo. Geralmente, sementes amiláceas são mais tolerantes à anoxia que sementes oleaginosas (Raymond, Al-Ani & Pradet, 1985), mas dentre os cereais cultivados, somente as sementes de arroz são capazes de produzir α -amilase durante a anoxia (Perata et al., 1992 e 1993).

A quantidade de açúcares solúveis disponíveis para a fermentação em sementes de cereais é, comumente, muito limitada, sendo o amido o principal carboidrato de reserva. A degradação total do amido, durante a germinação de sementes de cereais, ocorre em decorrência da ação conjunta das enzimas α -amilase, β -amilase, enzima desramificadora e α -glucosidase. Guglielminetti, Perata & Alpi (1995) demonstraram que sementes de arroz, germinando anaerobicamente, foram capazes de degradar grãos de amido *in vivo*. Esta capacidade foi relacionada com a síntese de novo de α -amilase e β -amilase, e ativação de enzimas pré-existent de isoformas da enzima desramificadora e α -glucosidase. Guglielminetti et al. (1995) observaram que plântulas de arroz foram capazes de degradar amido e sacarose até frutose-6-P, sob anoxia e propuseram que o metabolismo da sacarose ocorre, principalmente, pela via da sacarose sintase, em conjunto com nucleosídeo difosfato quinase, permitindo a ciclagem dos uridilatos. O gene de sacarose sintase é induzido em diversas espécies de plantas sob anoxia (McElfresh & Chourey, 1988; Chourey, Taliércio & Kane 1991; Ricard et al., 1991). Contudo, até agora, somente o arroz foi capaz de induzir anaerobicamente a sacarose sintase, tanto em âmbito transcricional como traducional (Ricard et al., 1991), enquanto que em milho e *Sorghum*, duas espécies com baixa tolerância a anoxia, a indução ocorreu apenas em nível transcricional (McElfresh & Chourey, 1988; Taliércio & Chourey, 1989; Chourey, Taliércio & Kane, 1991).

O amido não é a única fonte de carboidratos em sementes. Matheson (1990) cita que, em palmeiras, a principal reserva das células endospermicas é constituída de manana, um polímero de D-manose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), chegando a atingir 60% das sementes, ocorrendo como principal constituinte de uma parede celular muito espessa. As mananas podem ser degradadas pela ação conjunta da β -mananase e β -manosidase. Sachs (1862) e Keusch (1968), citados por Chandra Sekhar & DeMason (1990), estudando a germinação de

sementes de *Phoenix dactylifera*, observaram que seu pequeno embrião cônico desenvolve lentamente e seu cotilédone é transformado em um haustório, que drena os produtos da degradação das reservas durante a germinação.

O período de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas é crítico para o estabelecimento de uma espécie vegetal em seu habitat. Em um ambiente sujeito ao alagamento, a existência de mecanismos metabólicos de tolerância à hipoxia e/ou anoxia, em sementes e plântulas, é imprescindível. A existência de um “pool” de amido ou de uma reserva carbônica qualquer e de um sistema eficiente de degradação dessas reservas, até hexoses, que podem alimentar o fluxo glicolítico durante a ausência de oxigênio, é uma característica importante e pode definir a permanência de uma espécie em um hábitat sujeito ao alagamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Simulação da anoxia

Sementes e plântulas de açazeiro, aos cinquenta dias após a semeadura, foram submetidas à diferentes períodos de tempo aos tratamentos anóxico e aerado. O tratamento anóxico foi induzido colocando-se o material vegetal em frascos de vidro com tampas de rosca, cheios com água destilada, que, antes de serem fechados, foram borbulhados com gás nitrogênio, por um minuto. As sementes submetidas ao tratamento anóxico foram previamente submetidas a uma desinfestação, mergulhando-as em uma solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por um minuto e posterior lavagem com água destilada. Os experimentos foram realizados em câmara de germinação, com temperatura controlada ($35^{\circ}\text{C} \pm 1$), no escuro.

As plântulas e sementes do tratamento aerado foram colocadas em caixas plásticas contendo vermiculita, mantidas em sala de crescimento sob uma irradiância de fótons de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$, $30 \pm 5^\circ\text{C}$ e um fotoperíodo de 12 horas.

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento e dez sementes e/ou plântulas por parcela.

3.2 Curva de embebição

Vinte e cinco sementes de açaizeiro foram colocadas em germinador, sob 35°C , no escuro, envolvidas em papel de germinação, em frascos de vidro, nos quais foi adicionada água em quantidade suficiente para manter a umidade do papel, sem submergir as sementes. A cada 24 horas pesou-se cada semente, durante quinze dias consecutivos.

3.3 Interconversão de matéria seca entre endosperma e plântula durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula do açaizeiro

Sementes de açaizeiro foram colocadas para germinar em recipientes de plástico contendo vermiculita, em sala de crescimento, nas mesmas condições dos experimentos anteriores. Decorridos 0, 10, 25, 50, 75 e 100 dias após a semeadura, foram coletados três lotes de dez sementes e/ou plântulas, dependendo do período avaliado e foram colocadas para secar em estufa de circulação forçada, até massa constante. Após a secagem, foram separados e pesados os endospermas e o conjunto de plântula mais haustório. Registraram-se os diferentes estádios de desenvolvimento da plântula por meio de fotografia.

3.4 Estudo anatômico de sementes e plântulas de açaizeiro e determinação dos tecidos de acúmulo de amido

Seções transversais do endosperma da semente, do haustório, da base do caulículo. A um centímetro abaixo do ápice do eófilo (Figura 1) de plântulas de açaizeiro, foram corados com solução de azul de toluidina 1%, lugol (1g de iodo e 2g de iodeto de potássio em 300ml de água) e sulfato de Berberina (1%), durante dez minutos. Posteriormente, foram montadas lâminas em água e observadas em um microscópio de luz e fluorescência (microscópio de epifluorescência Olympus BX60), do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

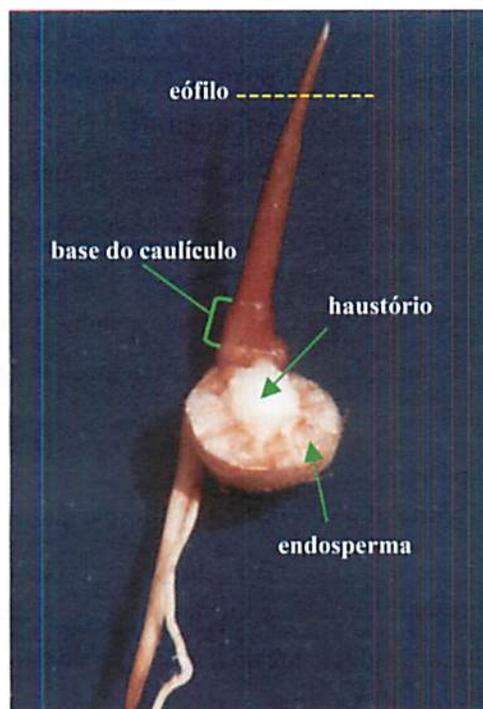


FIGURA 1- Plântula de açaizeiro com cinquenta dias após a semeadura, mostrando as principais estruturas e regiões nas quais foram realizados cortes transversais (haustório, endosperma, base do caulículo e eófilo).

A coloração com lugol permitiu a determinação das regiões das plântulas de açaizeiro que acumulam amido, as quais foram utilizadas nos estudos relativos à atividade amilolítica e à focalização isoeétrica.

3.5 Observação de células isoladas do endosperma e haustório de plântulas de açaizeiro

Pequenos pedaços do endosperma e haustório de plântulas foram macerados suavemente, após congelamento em nitrogênio líquido, em almofariz, em presença de água, para provocar a separação de algumas células intactas do tecido. Em seguida, filtrou-se o macerado através de uma tela de náilon com 60 µm, colocada no fundo de um ependorf de 1 ml. Posteriormente, retiraram-se algumas amostras de células retidas na tela, submetendo-as a soluções de azul de toluidina ou lugol, durante dez minutos. Essas amostras foram utilizadas na montagem de lâminas, em água e posterior observação em microscópio de luz.

3.6 Análise ultra-estrutural das células do endosperma de sementes

Amostras do endosperma de sementes secas do açaizeiro foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5% e cacodilato 0,05 M, pH 7,2), durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato por 3 vezes, durante 10 minutos cada vez e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2%, por, no mínimo, 5 horas. Posteriormente à fixação, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100 %), durante 10 minutos em cada solução e três vezes em acetona pura, e submetidas a uma série de soluções crescentes de resina Spurr, diluída em acetona (30%, 70% e 100%). Após o emblocamento em resina Spurr, realizou-se o toailete dos blocos, montagem em suporte feito de resina Spurr e os cortes no ultramicrotomo (Reichert-Jung). Os cortes foram fixados em grades de cobre de 300 mesh, que foram submetidas, sucessivamente, a acetato de uranila (3%) e acetato de chumbo (3%), durante 3 minutos cada. Os cortes foram observados no microscópio eletrônico de

transmissão do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Lavras (Zeiss EM-109).

3.7 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de endosperma e haustório, retiradas de plântulas de açaizeiro aos 35 dias após a semeadura, foram imersas em solução fixativa (Karnovisk's), pH 7,2, por um período de 24 horas. Em seguida, foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora e subsequente dessecadas em uma série de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, esta última por três vezes), e depois levadas para o aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Posteriormente, as amostras foram montadas em suportes de alumínio (*stubs*), com a ajuda de uma fita de carbono dupla face, colocadas sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro (evaporador de ouro BAL-TEC SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO 40XVP). Todas as atividades citadas nesse item foram desenvolvidas no Departamento de Patologia da Universidade Federal de Lavras.

3.8 Influência das reservas da semente sobre a sobrevivência de plântulas de açazeiro à anoxia

Plântulas de açazeiro com a primeira folha completamente expandida, com e sem sementes¹, foram submetidas a cinco, dez e vinte dias de anoxia. Posteriormente à aplicação dos tratamentos anóxicos, as plântulas foram transferidas para uma condição de normoxia, colocando-as em caixas de plástico com vermiculita, em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de $27 \pm 5^\circ\text{C}$ e uma irradiância de fótons de $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As condições da sala de crescimento foram mantidas nos demais experimentos. O tratamento testemunha constou de plântulas sem as sementes aderidas, sob condições de normoxia.

3.9 Determinação do período de tolerância máximo de sementes de açazeiro a anoxia

Seis lotes de vinte sementes de açazeiro por tratamento foram submetidos a um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze e doze meses de anoxia. Após cada período de anoxia, três lotes de sementes foram transferidos para a condição de normoxia, colocando-os em recipientes plásticos com vermiculita, em sala de crescimento, determinando-se a percentagem de germinação após vinte dias. Três lotes de vinte sementes foram secos em estufa de circulação forçada, até massa constante. Em seguida, foram trituradas em

¹ O termo semente é sinônimo de haustório, pois as plântulas de açazeiro utilizadas neste experimento estavam em um estágio de desenvolvimento em que suas reservas endospermicas já tinham sido totalmente degradadas pelo haustório.

moinho de bola, até a formação de um pó que foi utilizado na determinação de amido.

3.10 Determinação do teor de amido de sementes

Amostras de sementes antes da semeadura e após meses de anoxia (um, dois, três, e quatro meses) foram secas em estufa de circulação forçada, até massa constante. Posteriormente, o material seco foi triturado em moinho de bola até a formação de um pó, determinando-se o teor de amido através do método de Nelson (1944).

3.11 Avaliação qualitativa *in vivo* e *in vitro* da atividade amilolítica em sementes e plântulas de açaizeiro

Sementes sem o haustório e o haustório, ambos cortados pela metade, e seções transversais da base do caulículo de plântulas de açaizeiro que foram submetidas a diferentes tempos de tratamento anóxico (zero, um, cinco e dez dias), foram colocadas em placas de Petri contendo uma fina camada de meio de amido sólido, com a superfície cortada voltada para o meio composto de ágar 0,7%, amido solúvel 1% e acetato de sódio 200 mM (pH 5,4). As placas de Petri foram incubadas à temperatura de 35°C, por 3 horas, no escuro. Após o período de incubação, retiraram-se os cortes e adicionou-se às placas solução de lugol, fotografando-as após 3 horas.

Amostras de 100 mg de matéria fresca do endosperma e embrião de sementes de açaizeiro submetidas a vários tempos de anoxia (zero, um, cinco e dez dias), foram maceradas em almofariz, em presença de 1 ml de tampão de extração, contendo: CaCl₂ 10 mM, acetato de sódio 200 mM (pH 5.4) e DTT 1

mM, sobre gelo. Posteriormente, o macerado foi centrifugado a 10.000 g, sob 4°C, durante 15 minutos e 100 µL do sobrenadante foram adicionados em cavidades de uma placa de teste de ELISA, contendo 100 µL do mesmo meio sólido anteriormente utilizado no estudo da atividade amilolítica *in vivo*. As placas de ELISA foram cobertas com um filme de PVC e incubadas em câmara de germinação a 35°C, por 3 horas, no escuro. Após o período de incubação as placas foram reveladas com lugol e fotografadas. O mesmo procedimento foi realizado para plântulas aos cinquenta dias após a semeadura, submetidas a zero, um, cinco e dez dias de anoxia, utilizando-se o haustório, a base do caulículo e o endosperma da semente, ainda aderido à plântula.

Os extratos utilizados na focalização isoeétrica foram usados em outra avaliação qualitativa da atividade amilolítica, em que a quantidade de proteínas adicionadas nas cavidades da placa de ELISA foi igual. Para isso, adicionaram-se nas cavidades da placa de ELISA contendo 50 µL de meio sólido, extratos do endosperma, haustório e base do caulículo, contendo 50 µg de proteína. Posteriormente, as placas foram incubadas sob 35°C, durante 6 horas. Após o período de incubação, procedeu-se da mesma maneira que anteriormente.

Foram adicionados 90 µL dos extratos produzidos a partir do endosperma, haustório e base do caulículo de plântulas que foram submetidas aos tratamentos zero e cinco dias de anoxia, foram adicionados a eppendorf contendo 10 µL de tampão de extração. Antes de adicionar uma alíquota de 50 µL desses extratos na placa de ELISA, contendo 50 µL de meio sólido e incubá-la por 3 horas, sob 35°C submeteu-se cada uma, de três réplicas dos extratos, aos tratamentos: incubação sob 70°C, por 15 minutos, adição de EDTA (1 mM) e extrato sem tratamento algum (testemunha). Após o período de incubação, as placas foram reveladas com lugol e fotografadas.

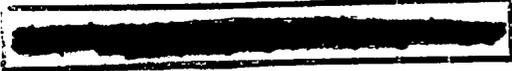
3.12 Focalização isoeétrica de enzimas amilolíticas

Plântulas de açaizeiro foram submetidas aos tratamentos zero, um e cinco dias de anoxia. Em seguida, tomaram-se amostras de 1g de matéria fresca do endosperma, haustório e base do caulículo que, depois de congelados com nitrogênio líquido, foram maceradas em almofariz, sobre gelo, contendo 1 mL do tampão de extração (CaCl₂ 10mM, acetato de sódio 200 mM, pH 5,4 e DTT 1 mM). O macerado obtido foi centrifugado por vinte minutos a 10.000g, sob 4°C. Posteriormente, utilizou-se o sobrenadante, contendo 50 µg de proteína (Bradford, 1976), para a focalização isoeétrica em gel contínuo de poliacrilamida (7,5%). O gel foi preparado de acordo com Alfenas (1998), adicionando-se 1% de amido solúvel e anfólitos (2%), com variação de pH de 5-7. Utilizaram-se NaOH (0,02 M) e H₂SO₄ (0.2%) como tampões do catodo e anodo, respectivamente. As condições de corrida foram: 150 V, 25 mA, 50 W, sob 4°C.

3.13 Avaliação qualitativa da atividade da enzima endo-β-mananase:

3.13.1 Preparo do extrato

Amostras de 1g de matéria fresca do endosperma e haustório de plântulas de açaizeiro com 50 dias após a semeadura, submetidas a 0 hora, 24 horas e 5 dias de anoxia foram congeladas com nitrogênio líquido e maceradas sobre gelo, em almofariz contendo 1ml de tampão citrato de sódio 50mM (pH 5,0). Posteriormente, o macerado foi centrifugado por vinte minutos a 10.000g, sob 4°C, coletando-se o sobrenadante e armazenando-o a -20°C.



3.13.2 Preparo do gel

Aqueceu-se em microondas, até a liquefação, a mistura contendo: agarose, 0,7%; 24 mL de locust bean gum 0,5% (galactomanana extraída de sementes de *Ceratonia siliqua*) e 6 mL de tampão citrato de sódio, feito a partir da mistura de 10 ml de solução de ácido cítrico (1M) e 50 mL de solução de Na_2HPO_4 (0,4 M), em um volume final de 200 mL, ajustando-se o pH para 5,0. Após o aquecimento, a mistura foi adicionada em uma moldura de vidro com 1mm de espessura e uma área interna de aproximadamente 48 cm², colocada sobre uma folha de gel bond em uma superfície de vidro plana.

A solução de locust bean gum (0,5%) foi feita aquecendo-se a mesma por 2 horas a 80°C, sob agitação. Posteriormente, deixou-se a solução esfriar em temperatura ambiente, centrifugando-a por dez minutos a 3000g, armazenando-se o sobrenadante sob -20°C. Durante o preparo da mistura do gel a solução de locust bean gum deve ser centrifugada novamente, sob as mesmas condições utilizadas durante sua preparação.

3.13.3 Aplicação do extrato e revelação do gel

Aplicaram-se 2 µL dos extratos produzidos no item 3.13.1 em orifícios de 2 mm de diâmetro, feitos no gel preparado de acordo com o item 3.12.2. Após 21 horas de incubação em câmara de germinação, sob 35°C, no escuro, em recipiente fechado, para impedir a desidratação do gel, revelou-se o gel procedendo-se da seguinte maneira: lavagem com água destilada; lavagem por trinta minutos em tampão citrato de sódio, o mesmo utilizado no preparo do gel, retirando-se seu excesso com água destilada; coloração com solução de vermelho congo (0,5%), durante trinta minutos; remoção do vermelho congo e adição de etanol 95%, por, no mínimo, dez minutos; remoção do etanol e adição

de solução de NaCl 1M (o gel deve ser mantido submerso na solução salina), até a mudança de cor do gel e formação de áreas esbranquiçadas que caracterizam a presença da atividade da endo β -mananase. Após o processo de revelação, os géis foram fotografados.

3.14 “Tissue printing” de endo- β -mananase

Sementes de açaizeiro foram colocadas em germinador, sob 35°C, no escuro, envolvidas em papel de germinação, em frascos de vidro, nos quais foi adicionada água em quantidade suficiente para manter a umidade do papel, sem submergir as sementes. No 5º, 10º e 15º dia de germinação, retiraram-se amostras de sementes que foram cortadas ao meio, retirando-se os haustórios das mesmas. Seis endospermas e seis haustórios cortados ao meio foram colocados no mesmo tipo de gel usado na avaliação qualitativa da endo- β -mananase, com os lados cortados em contato com o gel. Após os procedimentos de incubação e revelação do gel, relatados na avaliação qualitativa da atividade da endo- β -mananase, foram feitos os registros fotográficos.

3.15 Determinação do teor de água das sementes de açaizeiro

Cinquenta sementes de açaizeiro foram pesadas antes da secagem em estufa de circulação forçada e após secagem, até massa constante. Calculou-se o teor de água das sementes fazendo-se a diferença entre o peso úmido médio das sementes, dividido pelo peso médio das sementes secas, vezes cem, expresso em percentagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Curva de embebição

As sementes de açaizeiro apresentam duas fases bem distintas durante o processo de embebição (Figura 2). A primeira fase, que é caracterizada por um rápido aumento do conteúdo de água da semente, parece terminar no quarto dia de embebição, a partir do qual se inicia a segunda fase, caracterizando-se como um período de ativação metabólica em que a semente absorve pouca água.

Observou-se que a germinação das sementes de açaizeiro teve início a partir do quinto dia de embebição, logo após o início da segunda fase. Após onze dias de embebição, 100% das sementes de açaizeiro já tinham germinado. Considerou-se como semente germinada aquela em que houve a protusão do eixo hipocótilo radicular.

A ausência de uma terceira fase durante o processo de embebição das sementes de açaizeiro, que são endospermicas, está de acordo com Bewley & Black (1985) que afirmaram que endospermas ou cotilédones não persistentes de sementes não se expandem e, como consequência, não apresentam a terceira fase do processo de embebição.

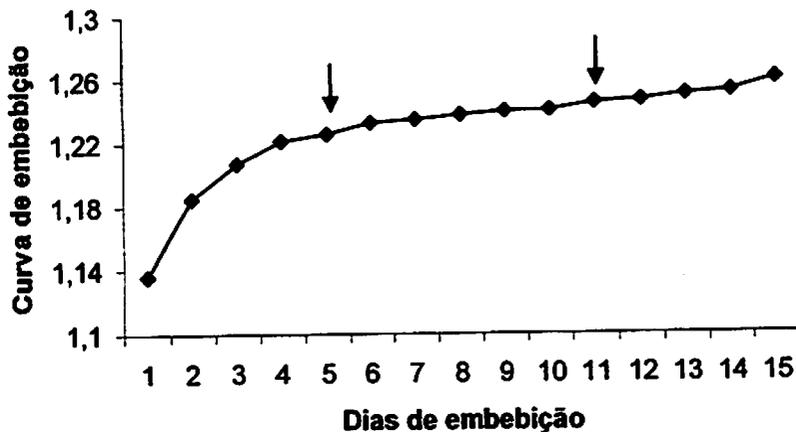


FIGURA 2 - Curva de embebição de sementes de açaizeiro. As setas indicam o início da germinação e o ponto em que 100% das sementes haviam germinado.

4.2 Interconversão de matéria seca entre endosperma e embrião, durante o processo germinativo e desenvolvimento da plântula do açaizeiro

Reduções expressivas da matéria seca do endosperma das sementes de açaizeiro foram possíveis de serem observadas já no décimo dia após a sementeira, intensificando-se a partir do quinquagésimo dia, quando então o embrião passou a sofrer aumentos significativos na matéria seca (Figura 3). Neste estágio, quando se intensificou o dreno de matéria seca do endosperma para a plântula, observou-se um haustório bem desenvolvido e que ainda pode ser distinguido do endosperma (Figura 4), atingindo quase que a metade do volume do endosperma.

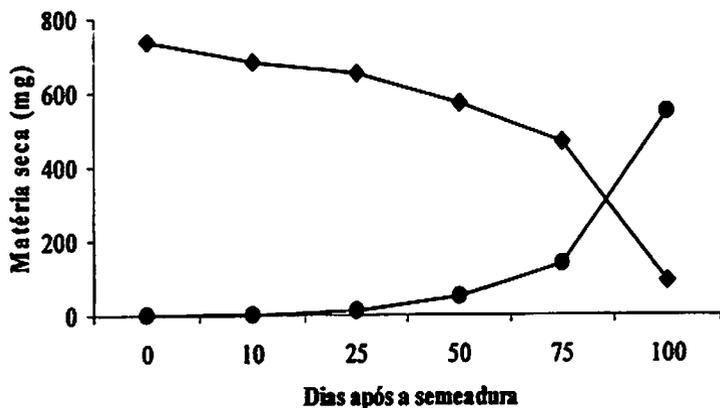


FIGURA 3 - Interconversão de matéria seca entre endosperma (♦) e embrião (●), durante a germinação e o desenvolvimento da plântula do açaizeiro.

O centésimo dia coincide com o desembainhamento da primeira folha e com o quase total consumo do endosperma (Figura 4), uma vez que o haustório apresenta-se ocupando toda a área que antes era ocupada pelo endosperma. Aparentemente, é nesse momento que a plântula se torna independente do endosperma da semente e fica dependente apenas das reservas, muito provavelmente o amido, acumuladas em seu haustório e/ou base do caulículo.

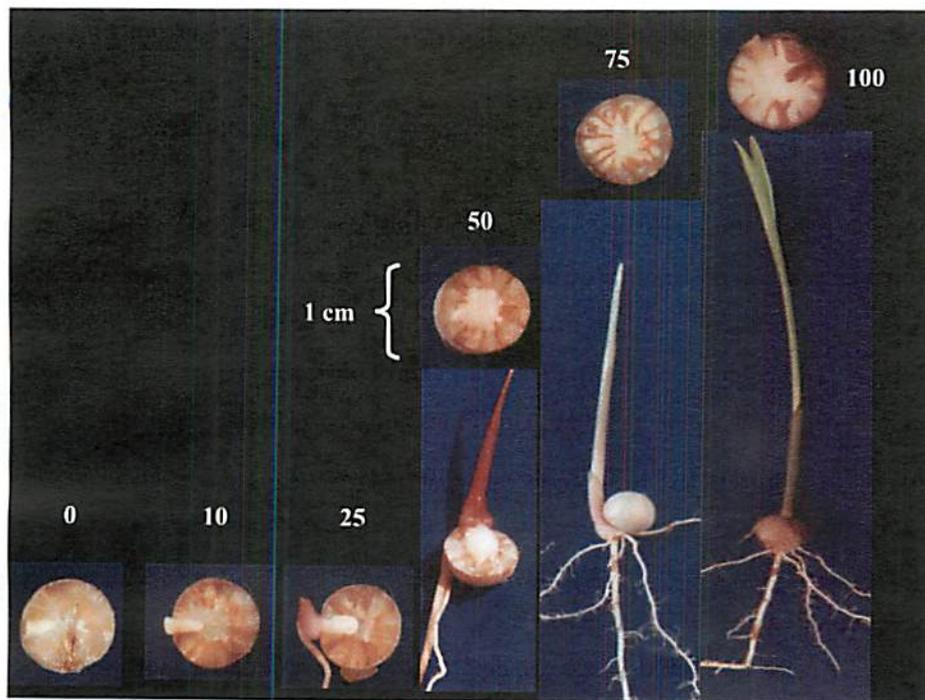


FIGURA 4 – Fases da germinação e desenvolvimento da plântula do açazeiro após 0, 10, 25, 50, 75 e 100 dias da sementeira.

4.3 Estudo anatômico de sementes e plântulas de açazeiro

Nas seções transversal e longitudinal do endosperma da semente do açazeiro (Figura 5, A e B), respectivamente, nota-se que as células do endosperma apresentam diferentes formas e uma parede celular bastante espessa, com muitas pontuações, ocupando grande parte do volume celular total. De maneira semelhante, Chandra Sekhar & DeMason (1987) demonstraram que as paredes das células do endosperma da semente da palmeira *Phoenix dactylifera* podem ocupar aproximadamente 65% do volume celular total, apresentando um

grande número de corpos protéicos, conteúdo citoplasmático reduzido e poucas mitocôndrias e plastídeos.

Tanto sementes de monocotiledôneas como de dicotiledôneas podem apresentar reservas na forma de polissacarídeos de parede. Estes podem estar presentes no endosperma (Arecaceae, Lilioflorae, Rubiaceae, Ebenaceae, Loganiaceae), no perisperma ou no cotilédone (Lupinus, Ceratonia, Impatiens).

Em todas as palmeiras investigadas por Meier & Reid (1982) e Mayer & Polijakoff-Mayber (1989), as paredes das células do endosperma das sementes eram constituídas de manana. Manana é um polissacarídeo de parede formado por longas cadeias lineares de manose em ligações β -1,4, praticamente sem ramificações. Para Matheson (1990) a manana é o principal constituinte das células endospermicas de sementes da palmeira *Phytelaphas macrocarpa*, podendo atingir 60% de sua massa seca.

Apesar de o amido ser o principal carboidrato de reserva na maioria das sementes, em sementes de açaizeiro ele parece ter uma importância secundária em termos quantitativos, pois o teor de amido em suas sementes atingiu um valor médio de, aproximadamente, 16% da matéria seca, muito inferior aos valores de manana comumente observados em sementes de outras palmeiras. Nestas sementes, a manana desempenha duas funções: confere resistência mecânica permitindo maior proteção ao embrião; serve como reserva de carboidratos, que são digeridos durante a germinação e convertidos à sacarose para a nutrição da plântula em desenvolvimento (Carpita & McCann, 2000).

As paredes celulares de sementes podem ser degradadas durante a germinação, produzindo um importante suprimento adicional de carboidratos para o desenvolvimento da plântula. Esta função nutritiva é especialmente evidente durante a degradação de paredes celulares grossas de células do endosperma ou cotilédone de algumas sementes (Meier & Reid, 1982; Halmer & Bewley, 1982; Ashford & Gubler, 1984; Halmer, 1985).

A seqüência de degradação das paredes celulares no endosperma é variável entre taxa, dependendo da localização das enzimas degradativas. Em leguminosas, como em *Trigonella foenum-graecum*, a degradação das paredes do endosperma inicia nas células próximas as células da camada de aleurona (Jacobsen, 1984). Já em *Ceratonia siliqua* ela ocorre mais uniformemente em todo o endosperma (Seiler, 1977, citado por Werker, 1997)

As paredes das células endospermicas das sementes de açaizeiro são alongadas e apresentam um grande número de pontoações. Nas imagens da Figura 5 - A (canto inferior direito), percebe-se que as pontoações de células adjacentes do endosperma da semente de açaizeiro não apresentam conexões plasmodésmicas. Apesar de existir uma redução na espessura da parede nas regiões de pontoação, há uma porção de parede bastante considerável entre a lamela média e o conteúdo citoplasmático de células adjacentes. A provável inexistência de conexões plasmodésmicas, entre as células do endosperma da semente do açaizeiro, pode possibilitar que o processo degradativo das reservas contidas em suas paredes ocorra de maneira gradual, nas proximidades do haustório em desenvolvimento. Com a degradação das paredes nas regiões de pontoação, as enzimas responsáveis pela degradação da manana (mananase e manosidase) podem passar para uma outra camada de células, iniciando o processo degradativo nas mesmas. Esse processo parece ocorrer radialmente, do centro do endosperma para a periferia, e deve ser controlado pelo haustório. Caso existissem conexões plasmodésmicas entre as células do endosperma a degradação, muito provavelmente, poderia ser generalizada. O processo iniciado na camada mais interna tenderia a se difundir para as camadas mais externas, promovendo o enfraquecimento das paredes, o que poderia facilitar o ataque de microorganismos. Além disso, o haustório poderia não ser capaz de assimilar todo o açúcar liberado a partir da degradação das paredes endospermicas.

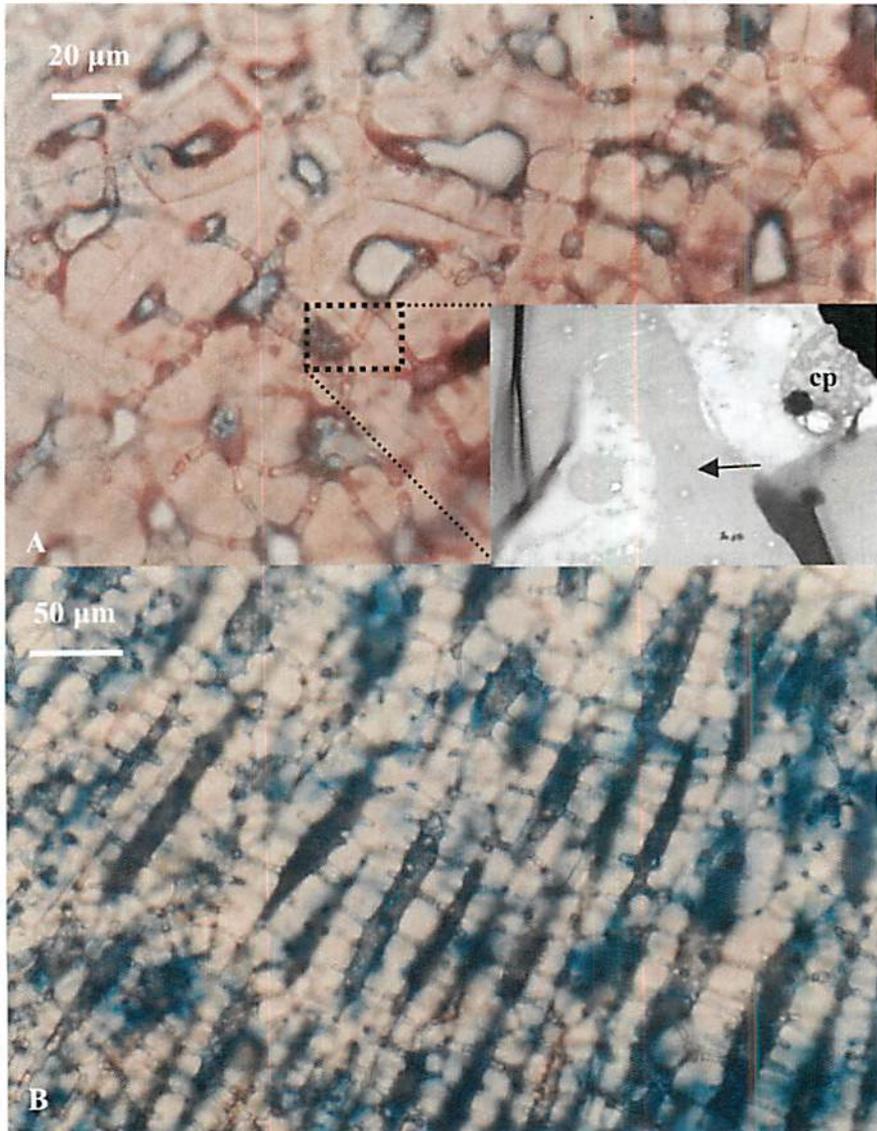


FIGURA 5 - (A) Seção transversal do endosperma da semente de açaizeiro, mostrando células com diferentes formas, paredes espessadas e muitas pontoações (retângulo pontilhado). No canto inferior direito pode ser vista uma fotomicrografia eletrônica com detalhe de duas pontoações entre células adjacentes, mostrando a lamela média (seta) e um corpo protéico (cp). (B) Seção longitudinal do endosperma da semente de açaizeiro, mostrando células alongadas com numerosas pontoações e conteúdo citoplasmático intensamente corado com azul de toluidina.

A testa da semente do açaizeiro é do tipo ruminada. Caracteriza-se pela incrustação da testa, que penetra no endosperma, formando linhas de células por todo o endosperma. No endosperma da semente do açaizeiro essas linhas vão da periferia da semente até os arredores do centro e são bem visíveis nas sementes de plântulas de açaizeiro com 75 dias após a sementeira (Figura 4). Detalhe da expansão das células da testa, rumo ao interior do endosperma pode ser observado na Figura 6-A. De Paula (1975), estudando a anatomia do açaizeiro (*Euterpe oleracea*), cita que essas projeções do tegumento são formadas por 8 a 13 camadas de células de largura, de paredes finas, pectocelulósicas, ricas em substâncias de reserva.

Não está estabelecido se a ruminação do endosperma e/ou da testa tem alguma função durante o desenvolvimento ou germinação da semente. Boesewinkel & Bouman (1984), têm sugerido que a ruminação do endosperma, ao causar o aumento da superfície de contato entre a testa e o endosperma, pode facilitar a entrada de água, oxigênio e/ou nutrientes a partir da testa.

Células isoladas do endosperma, coradas com azul de toluidina (Figura 6-B), mostram que as mesmas podem apresentar formas distintas. Na mesma figura nota-se, nitidamente, a forma do citoplasma das células do endosperma, em azul, com numerosas pontuações. O formato irregular pode ser importante no processo de degradação dos polissacarídeos de parede durante a germinação, pois possibilitaria o aumento da superfície de contato entre a endo- β -mananase e o principal constituinte das paredes das células endospermicas, a manana. Tanto as células endospermicas como as do haustório apresentam amido, pois ficaram intensamente coradas após serem submetidas à lugol (Figura 6- C e D). Nas células do haustório é fácil visualizar grãos de amido dentro de pequenas células parenquimáticas de parede delgada.

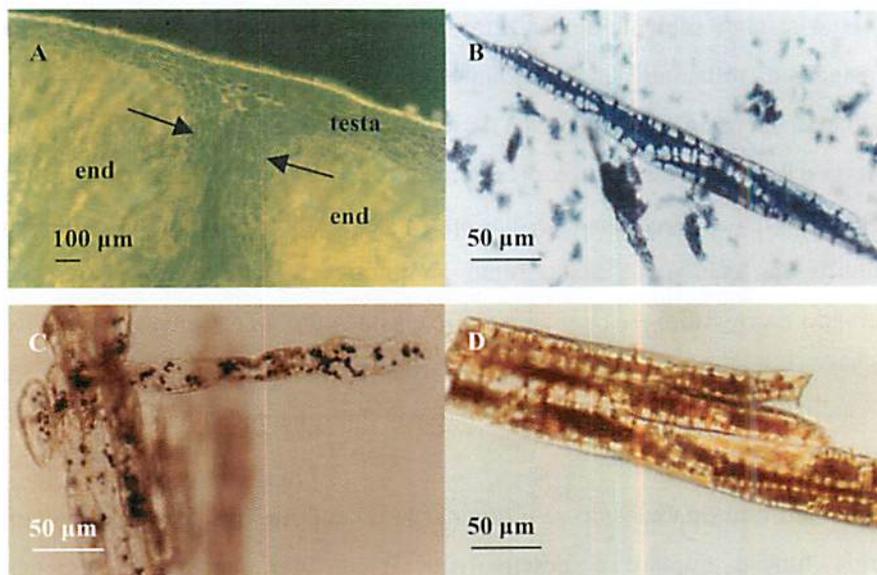


FIGURA 6 – (A) Seção transversal do endosperma da semente de açaizeiro mostrando as projeções da testa ($\rightarrow \leftarrow$) através do endosperma (end), que caracterizam uma testa ruminada, observada através de um microscópio de epifluorescência. Os cortes foram submetidos a sulfato de berberina (1%). (B) Grupo de células do endosperma da semente de açaizeiro, mostrando o conteúdo citoplasmático em azul e as paredes celulares translúcidas e espessadas, ricas em pontoações. Grupos de células do haustório (C) e do endosperma (D) de plântulas de açaizeiro com 50 dias após a semeadura, coradas com lugol. As células do haustório apresentam diversos grãos de amido e possuem paredes delgadas. As células do endosperma são irregulares e de paredes espessas, com citoplasmas intensamente corados, caracterizando uma reserva de amido em seu interior.

O estudo anatômico de plântulas aos cinquenta dias após a semeadura demonstrou que os principais locais de acúmulo de amido são: endosperma, haustório, que nessa fase ocupa quase que a metade do volume do endosperma (Figura 4) e base do caulículo (Figura 7, A e B). A região do eófilo (Figura 7, C e D) não apresenta muitos grãos de amido, contudo, a endoderme dos feixes vasculares, tanto das pinas como nas bainhas, apresentam alguns grãos de amido.

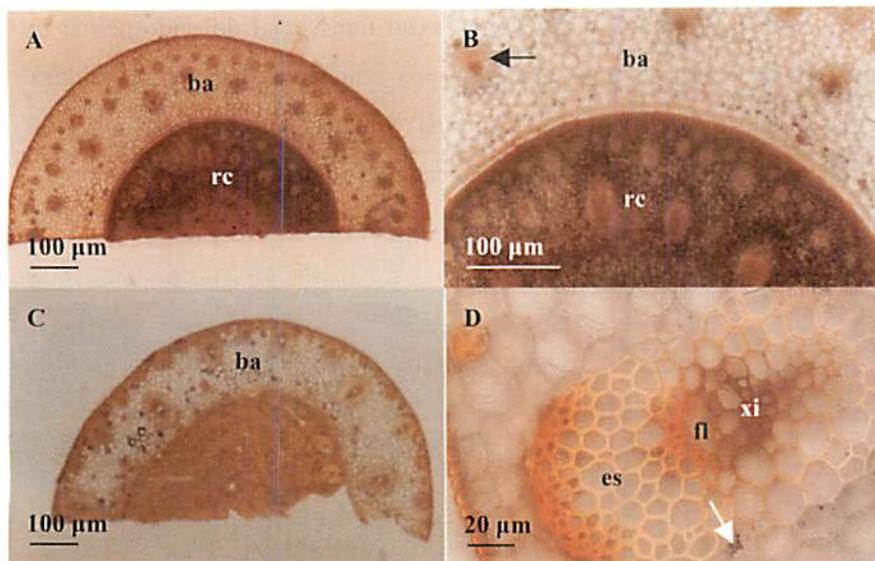


FIGURA 7 – (A e B) Seções transversais da base do caulículo de plântulas de açaizeiro aos 50 dias após a sementeira, corados com lugol. Mostrando a região central (rc) com abundante quantidade de grãos de amido e primeira bainha (ba), com diversos feixes vasculares (seta). (C) - Seção transversal do eófilo a um centímetro do ápice da plântula de açaizeiro aos 50 dias após a sementeira, mostrando pinas (pi) dobradas envolvidas pela segunda bainha (ba) com diversos feixes vasculares. (D) Detalhe de um feixe vascular da segunda bainha, com endoderme (end) apresentando grãos de amido (seta); xi, xilema; fl, floema; es, esclerênquima.

As sementes de monocotiledôneas são tipicamente albuminosas e têm uma germinação hipógea. Entretanto, membros da família *Arecaceae* (*Palmae*) possuem um comportamento muito incomum durante a germinação: a porção distal de seu cotilédono permanece dentro da semente e, ao expandir-se (funcionando como um haustório), drena as reservas do endosperma, ocupando seu lugar (Gatin, 1906; Thiselton-Dyer, 1910; Tomlinson, 1960). Este fenômeno é acompanhado pela produção de endo β -mananase e β -manosidase (Halmer, 1985; Bewley & Reid, 1985).

A foto da Figura 8 mostra uma seção transversal do endosperma da semente de açaizeiro de uma plântula após cinquenta dias da sementeira. Observa-se que a região do endosperma voltada para o haustório está parcialmente degradada, tendo sua porção central já sido totalmente consumida, dando lugar ao haustório.



FIGURA 8 – Seção transversal do endosperma da semente de açaizeiro de uma plântula com 50 dias após a sementeira, mostrando região parcialmente degradada (canto inferior direito) do endosperma.

A Figura 9-A mostra, em vista frontal, parte do endosperma de uma semente de açaizeiro com 35 dias após a sementeira, depois da retirada do haustório (Figura 9-B). Percebem-se, na cavidade em que o haustório se encontrava, restos das células do endosperma ao fundo e, em detalhe, uma região com um grupo de células endospermicas ainda intactas e outras

parcialmente degradadas (Figura 9-C). Estes resultados parecem confirmar que o haustório coordena a degradação do endosperma.

Keusch (1968), citado por Chandra Sekhar & DeMason (1990), hipotetizou que o haustório de plântulas de *Phoenix dactylifera* L. tem duas funções biológicas: secreção de exoenzimas hidrolíticas para o endosperma e absorção dos produtos provenientes da degradação do endosperma. Esta possível excreção de enzimas hidrolíticas para o endosperma pelo embrião é perfeitamente compatível com a observação de que as células dos embriões de *Phoenix dactylifera* possuem mais que metade do volume celular total ocupado por corpos protéicos (Chandra Sekhar & DeMason, 1987).

A degradação do endosperma de sementes de açaizeiro parece ocorrer, inicialmente, nas células endospérmicas localizadas no centro de porções do endosperma circundadas pelas projeções da testa (Figura 10-A), continuando até atingir as referidas projeções, que não são degradadas. Isso pode ser notado observando-se a fotografia em corte da semente ainda aderida à plântula de açaizeiro aos 75 dias após a semeadura (Figura 4).

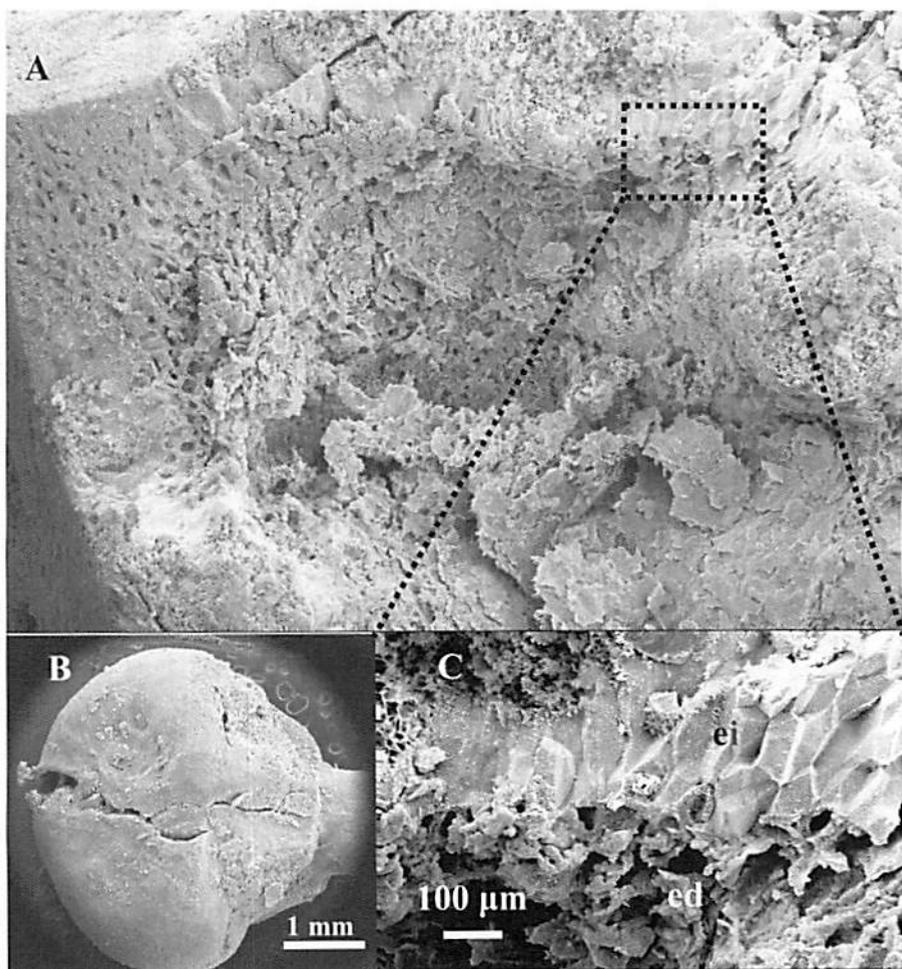


FIGURA 9 – Vista frontal de parte do endosperma de semente de açaizeiro com 35 dias após a sementeira. Mostrando cavidade com resíduos de células endospermicas ao fundo (A), depois da retirada do haustório (em detalhe em B) e região de transição entre uma área íntegra e degradada do endosperma (em detalhe em C).

Bewley & Black (1985) citam que a hidrólise de polissacarídeos de parede do endosperma (89% de manose depositada em paredes secundárias²) de *Phoenix dactylifera* ocorre durante a liberação de exoenzimas pelo haustório e quando a manana é hidrolisada a manose, a qual é absorvida pelo haustório e transportada até o eixo embrionário, onde é convertida à sacarose. A mobilização de mananas das paredes celulares do endosperma de sementes de alface, por outro lado, envolvem a síntese de mananase a partir do próprio endosperma (Halmer, 1985).

DeMason et al. (1985), estudando a germinação de *Phoenix dactylifera*, citam que o haustório pode não ser responsável pela produção das enzimas β -mananase e β -manosidase e que as mesmas podem ser ativadas nas células endospermicas por um sinal desconhecido vindo do haustório. Afirmam também que o conteúdo de cada célula endospermica é mobilizado primeiro, seguido pela mobilização da parede, e que a digestão da parede celular de cada célula endospermica ocorre a partir do citoplasma, em direção à lamela média.

O sentido da degradação das paredes celulares do endosperma de sementes de *Phoenix dactylifera* - de dentro para fora - é uma importante evidência da função das pontoações nas células endospermicas do açaizeiro. É provável que as pontoações facilitem a entrada da endo β -mananase proveniente do haustório, pois apresentam paredes com uma espessura bem inferior aos locais da parede sem pontoação. Após sua entrada na célula, via degradação da parede menos espessa na região de pontoação, a endo β -mananase começa o processo de degradação da parede celular, de dentro para fora. Usar essa evidência como prova de que o endosperma é o responsável pela degradação de suas paredes parece ser um equívoco.

² Contrariando Bewley & Black (1985), DeMason; Chandra Sekhar & Harris (1989), afirmam que as paredes das células endospermicas de *Phoenix dactylifera* são primárias, pois sua deposição ocorreu durante o alongamento celular.

Observando-se a Figura 10-B, parece que as projeções da testa podem apresentar alguma função no transporte de substâncias provenientes da degradação do endosperma, até o tecido condutor do haustório. Isso porque o tecido vascular do haustório está distribuído de maneira a acompanhar essas projeções, estabelecendo um contato direto com as mesmas. As projeções da testa também podem estar envolvidas no processo de condução de carboidratos, provenientes da degradação do amido das células endospermicas de sementes de açaizeiro, durante a anoxia, permitindo que o embrião receba um suprimento de carboidratos suficiente para mantê-lo vivo, pois a distância entre o embrião e as células endospermicas mais afastadas do mesmo é grande. O transporte difusivo destes açúcares até o embrião é pouco provável, haja vista a quase inexistência de espaços intercelulares entre as células endospermicas.

Futuros trabalhos que avaliem a ultra-estrutura das células deste tecido e a existência de conexões plasmodémicas entre as mesmas, possibilitando o transporte passivo de açúcares, e que demonstrem quais os açúcares transportados nestas projeções, serão cruciais para o entendimento de como o embrião do açaizeiro consegue suportar até quatro meses de anoxia.

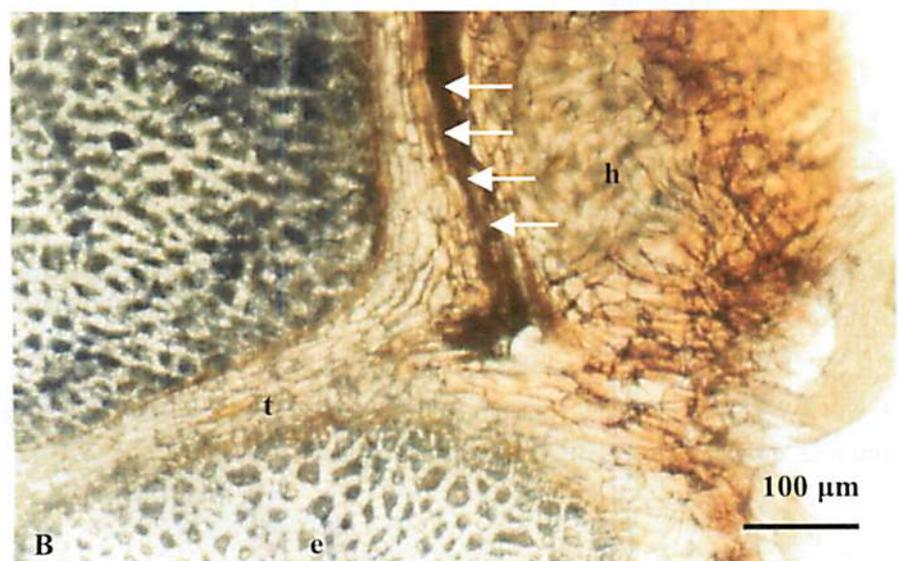


FIGURA 10 – Seção transversal do endosperma da semente de açaizeiro de plântula após 50 dias da semeadura. (A) Regiões do endosperma (e) parcialmente degradadas, envolvidas por projeções da testa (t) e pequena porção do haustório (h). (B) Detalhe do tecido vascular do haustório, formado nas proximidades das projeções do endosperma (setas).

Em *Phoenix dactylifera* (DeMason & Thomson, 1981) um único cotilédone, circundando o epicótilo, originado a partir de um pequeno eixo hipocótilo-radicular, é muito simples em forma. Ele consiste de protoderme, parênquima de reserva e procâmbio. O sistema procambial é formado por uma fita única no hipocótilo, a qual se ramifica dentro de um anel de 7-8 feixes, que continuam o processo de bifurcação até formarem 49 ou mais feixes separados na extremidade do cotilédone. O embrião do açaizeiro, em seção longitudinal e transversal (Figura 11-A e B, respectivamente), apresenta uma estrutura bastante semelhante a do embrião de *Phoenix dactylifera*, constituído por: eixo hipocótilo-radicular; procâmbio, que se ramifica, inicialmente em seis feixes e, posteriormente, no sentido oposto ao eixo hipocótilo-radicular, formando aproximadamente 30 faixas de procâmbio na extremidade do cotilédone (haustório) e parênquima de reserva, rico em idioblastos contendo ráfides.

Sabe-se muito pouco sobre o mecanismo de transporte de açúcares - provenientes da degradação do endosperma de palmeiras - para o haustório. Resultados obtidos por Zambou & Spyropoulos (1999), em estudo com cotilédones da leguminosa *Trigonella foenum-graecum* L., indicam que a D-manose é parcialmente transportada por um carregador que tem uma alta especificidade pela mesma e não por um sistema de cotransporte açúcar/H⁺. indicaram também que este carregador desempenha um papel importante durante o processo de ativação e desativação da absorção dos cotilédones desta leguminosa, durante o desenvolvimento das plântulas.

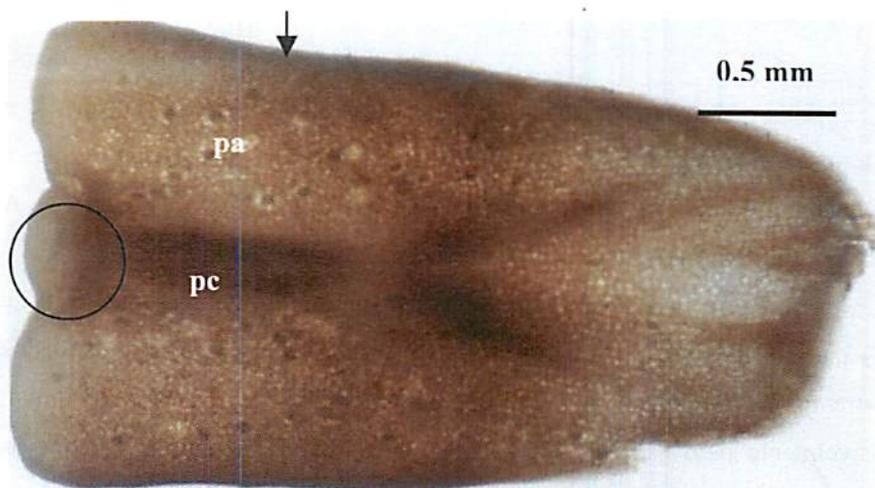


FIGURA 11 - Seção longitudinal do embrião de açazeiro, mostrando o eixo hipocótilo-radicular (círculo); procâmbio (pc) e parênquima com numerosos idioblastos com ráfides (pa). A seta indica a região de corte da figura 12.

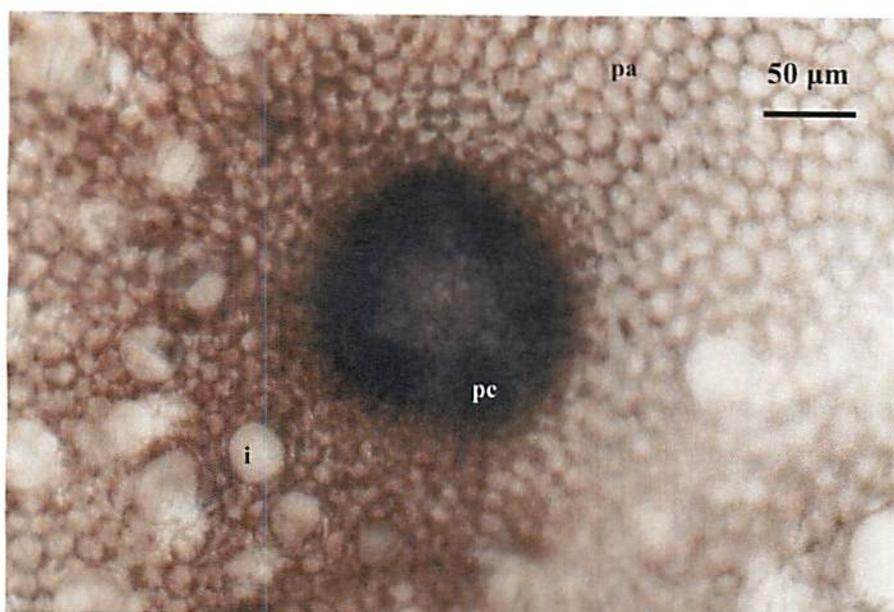


FIGURA 12 - Seção transversal na região do hipocótilo, mostrando seis feixes de procâmbio (pc) e parênquima (pa) com abundante quantidade de idioblastos de ráfides (i).

4.4 Tolerância de sementes de açazeiro a anoxia

Após submeter sementes de açazeiro a diversos meses de anoxia e posterior transferência para condições de normoxia, observou-se que a porcentagem de germinação foi elevada até o quarto mês (80%) (Figura 13). A partir do quinto mês de anoxia, a germinação foi totalmente inibida.

Durante o período de estresse, o teor de amido nas sementes caiu de 17% para 2%, ao final do quarto mês de anoxia (Figura 14). Esses resultados mostram que, durante a anaerobiose, há uma forte degradação do amido, possivelmente pelo estímulo da glicólise e da rota fermentativa, em que as desidrogenases alcoólicas e lácticas são as principais enzimas envolvidas (Neto; Alves & Oliveira, 1995b). Comparando-se os resultados dos teores de amido com os da germinação, parece que 2% é a concentração mínima desse carboidrato capaz de garantir o processo germinativo de sementes de açazeiro em níveis satisfatórios.

Trabalhos com rizomas e folhas de *Scheonoplectus lacustris*, *Scirpus maritimus*, *Typha angustifolia* (Armstrong, Brändle & Jackson, 1994; Barclay & Crawford, 1982); ramos e tubérculos da monocotiledônea aquática *Potamogeton pectinatus* (Summers & Jackson, 1996) e da monocotiledônea anfibia *Acorus calamus* (Bucher & Kuhlemeier, 1993) demonstram que essas espécies são capazes de tolerar de semanas a meses de anoxia e que essa tolerância está relacionada à presença de reservas de amido. Assim como nas espécies anteriormente citadas, o amido também é a reserva de carboidrato indispensável à sobrevivência de sementes de açazeiro.

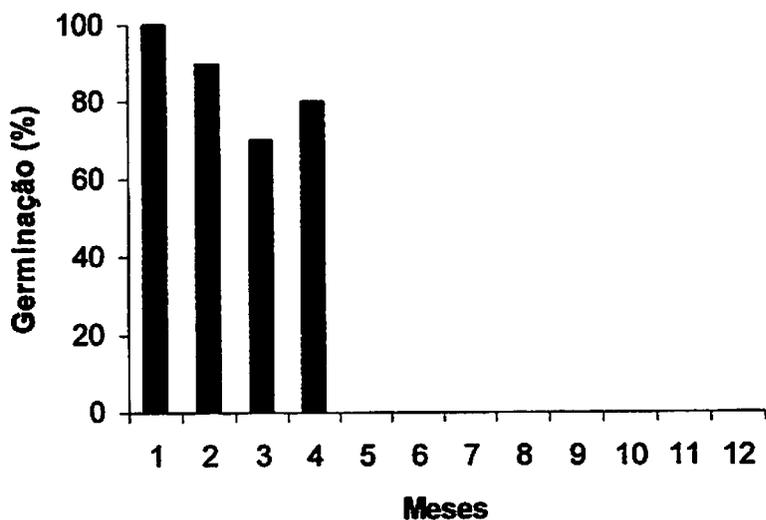


FIGURA 13 - Percentagem de germinação de sementes de açazeiro após serem submetidas a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 meses de anoxia e posterior transferência para condições de normoxia.

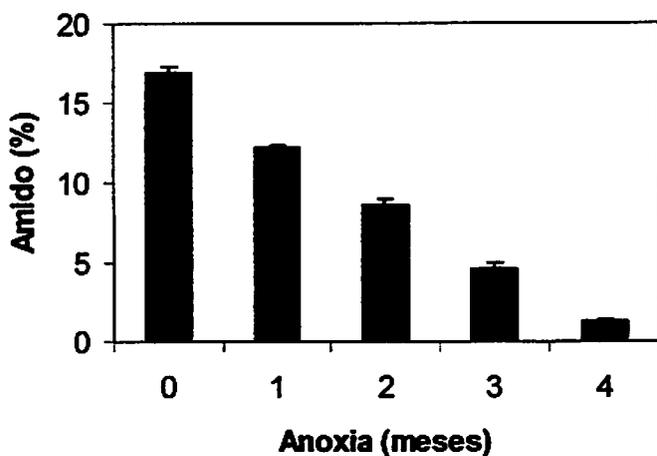
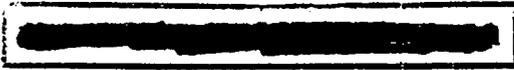


FIGURA 14 - Percentagem de amido em sementes de açazeiro após 0, 1, 2, 3 e 4 meses de anoxia.



4.5 Efeito da anoxia sobre o consumo de amido do haustório de plântulas de açazeiro

Nota-se que os grãos de amido contidos no haustório de plântulas em condição de normoxia desapareceram após 25 dias de anoxia (Figura 15-A e B). Este resultado comprova a manutenção da atividade amilolítica no haustório de plântulas de açazeiro durante a anoxia, e explica a sobrevivência de 100% das plântulas de açazeiro após 16 dias de anoxia (Neto; Alves & Oliveira, 1995a).

O haustório não é a única fonte de amido em plântulas de açazeiro com cinquenta dias após a semeadura. O estudo anatômico mostrou que a base da plântula do açazeiro também armazena um abundante número de grãos de amido (Figura 7 – A e B). Esse amido também pode ser importante durante períodos de anoxia, como fonte de carbono respirável.

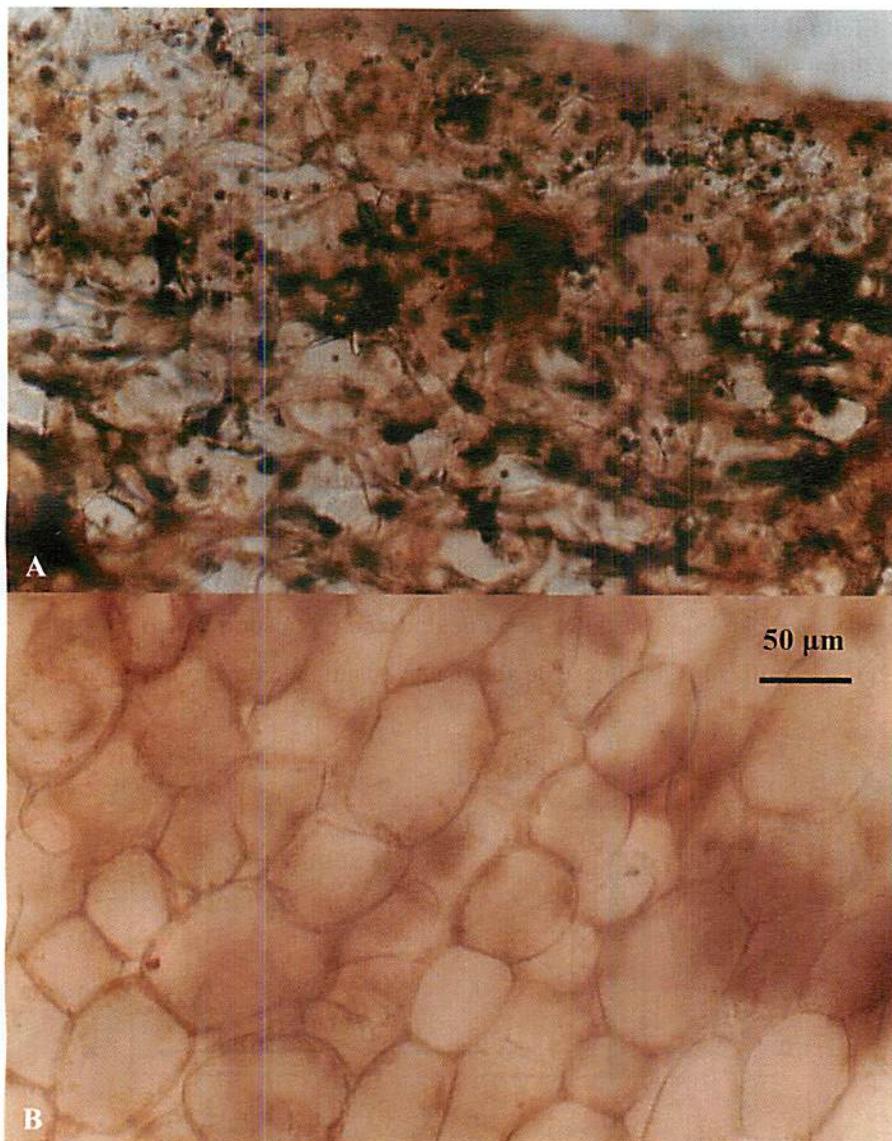


FIGURA 15 - Seção transversal do haustório de plântulas de açaizeiro aos 50 dias após a semeadura, submetidas à condição de normoxia (A) e a 25 dias de anoxia (B), mostrando o desaparecimento dos grãos de amido do haustório de plântulas submetidas a 25 dias de anoxia.

4.6 Efeito das reservas das sementes sobre a sobrevivência de plântulas de açaí pós-anoxia

A sobrevivência das plântulas sem semente sob normoxia e a morte daquelas com semente, submetidas à anoxia, comprovou que não foi a retirada da semente que ocasionou a morte das mesmas, mas a anoxia. Estes resultados foram contrastaram com os obtidos por Neto, Alves & Oliveira (1995b), que observaram que plântulas de açaizeiro suportaram até 16 dias de anoxia sem crescimento aparente, voltando a crescer quando submetidas à normoxia. Entretanto, é importante destacar que as plântulas utilizadas pelos referidos autores estavam em um estágio em que ainda apresentavam reservas, tanto no haustório como no endosperma da semente. Durante o desenvolvimento normal das plântulas de açaizeiro, tanto o amido como a manana do endosperma são degradados e parte dos produtos desta degradação é transportada ao haustório, em que são utilizados na síntese de abundante quantidade de amido (Figura 15-A).

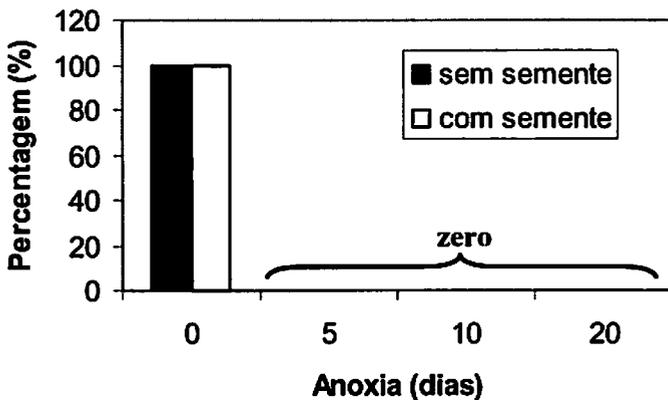


FIGURA 16 - Percentagem de sobrevivência de plântulas de açaizeiro, com a primeira folha, com e sem sementes aderidas, após 0, 5, 10, e 20 dias de anoxia e transferência para condições de normoxia.

Os resultados demonstram que as plântulas de açazeiro, com o primeiro par de folhas, dependem totalmente das reservas do haustório e/ou de reservas acumuladas na própria plântula, para sobreviverem à anoxia. O fato das plântulas com semente terem morrido após os diferentes tempos de anoxia confirma isso, pois, ao observar a fotografia de uma plântula de açazeiro aos cem dias após a semeadura (Figura 4), nota-se que as reservas do endosperma da semente já foram quase que totalmente consumidas pelo haustório e a primeira folha ainda não está totalmente expandida, o que já se observava nas plântulas utilizadas no experimento. Mais uma vez, constata-se que uma fonte de reservas de carboidratos é fundamental para a tolerância a anoxia, e, quanto mais avançado o estágio de desenvolvimento da plântula, menor será o tempo de tolerância à anoxia, pois menos reserva terá à sua disposição.

O fato das plântulas terem sido mantidas em um ambiente controlado, com uma iluminação artificial de baixa intensidade, pode não ter permitido um acúmulo de amido em outras partes da plântula, que poderia ter ocorrido em uma condição natural, a partir da atividade fotossintética. Isto poderia ter aumentado o tempo de tolerância das mesmas à anoxia, mesmo sem as reservas do haustório. Além disso, em condições naturais, as plântulas de açazeiro são submetidas a períodos de anoxia seguidos de aeração, quando em várzeas sujeitas à influência das marés. Nestas condições esta dependência das reservas do haustório, neste estágio de desenvolvimento (com a primeira folha expandida), pode não ser tão decisiva.

4.7 Avaliação qualitativa da atividade amilolítica em sementes e plântulas de açazeiro

A maior degradação do amido nas cavidades em que foram adicionados os extratos mostra que, independente do tempo de anoxia, o endosperma foi a

parte da semente (Figura 17) e da plântula (Figura 18) que apresentou a maior atividade amilolítica. Percebe-se o mesmo comportamento na avaliação feita em plântulas no ensaio *in vivo* (Figura 19). Quando foram utilizados extratos com a mesma quantidade de proteínas, notou-se que não houve diferença entre os tecidos, porém, houve diferença entre os tempos de anoxia aplicados (Figura 20).

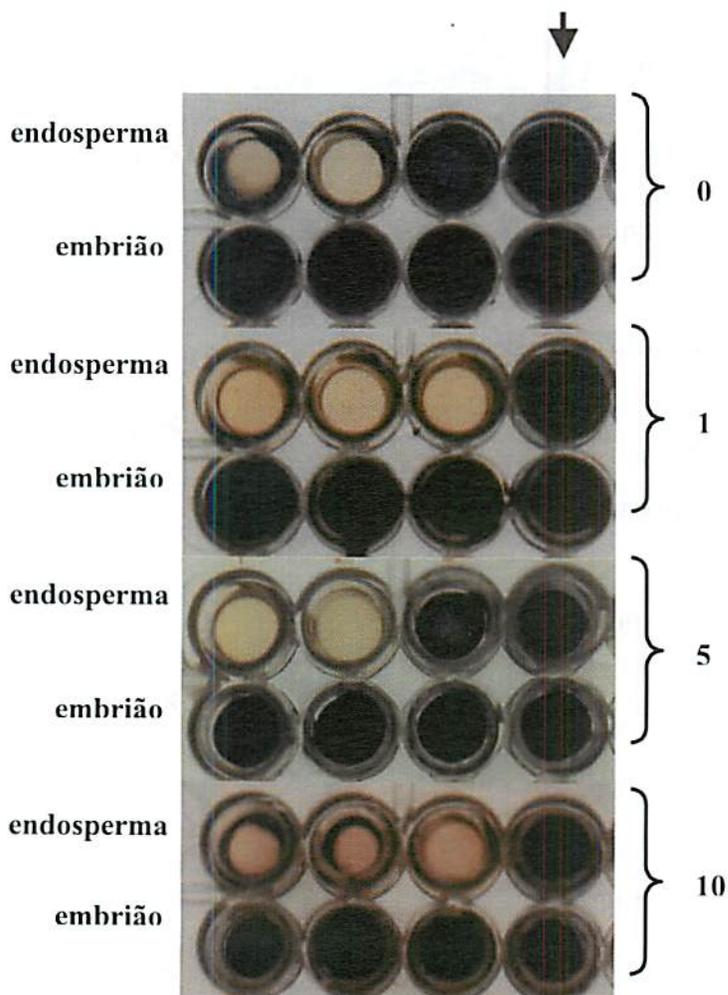


FIGURA 17 - Atividade amilolítica de extratos do endosperma e embrião de sementes de açaizeiro submetidas a 0, 1, 5 e 10 dias de anoxia (↓- sem extrato).

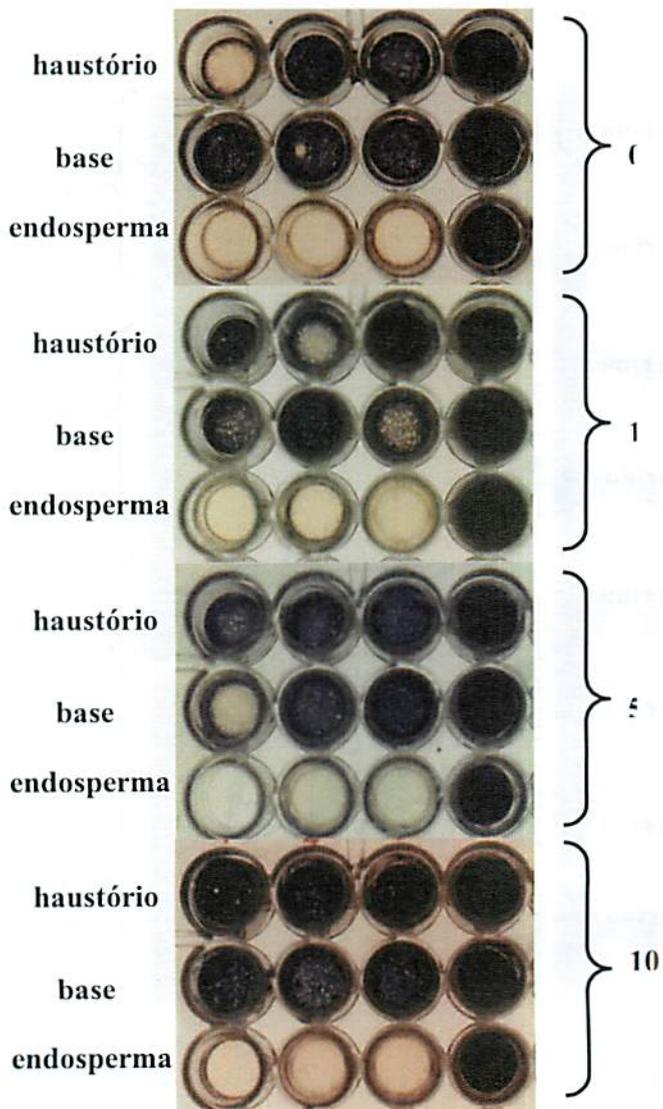


FIGURA 18 - Atividade amilolítica de extratos do haustório, base do caulículo e endosperma, após 0, 1, 5 e 10 dias de anoxia (↓- sem extrato).

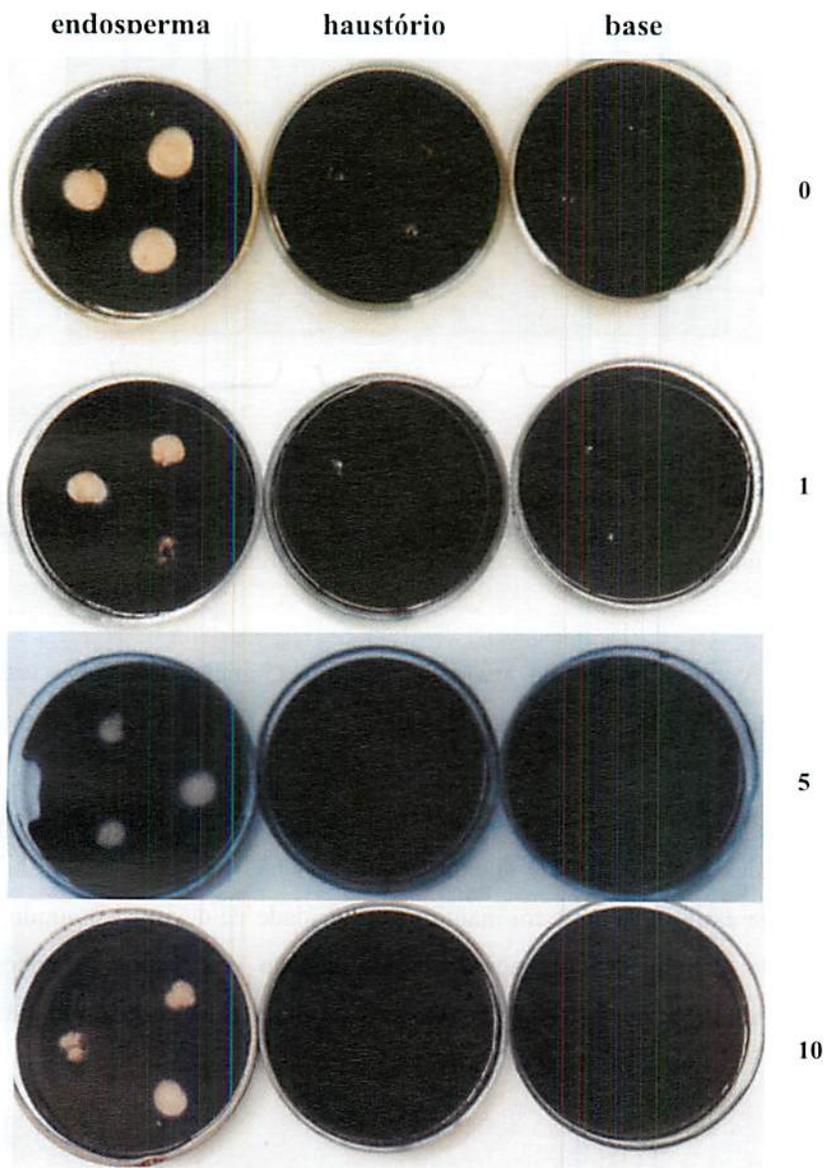


FIGURA 19 – Atividade amilolítica *in vivo* do endosperma, haustório e base do caulículo de plântulas de açaizeiro com 50 dias após a semeadura, submetidas a 0, 1, 5 e 10 dias de anoxia.

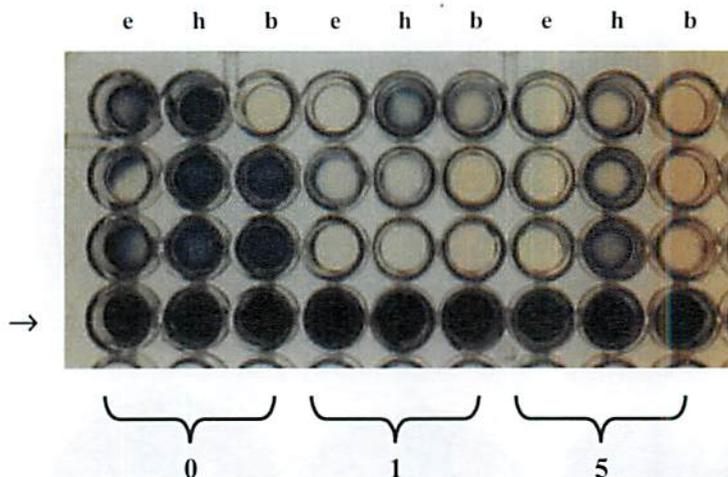


FIGURA 20 - Atividade amilolítica de extratos do endosperma (e), haustório (h) e base do caulículo (b) após 0, 1 e 5 dias de anoxia. (→-sem extrato). Em cada cavidade foi aplicada uma quantidade de extrato contendo 50 μg de proteína.

A superioridade da atividade amilolítica, inicialmente observada no endosperma, parece ser reflexo da maior quantidade de proteínas do mesmo, quando comparada com a do haustório e da base do caulículo (Figura 21).

A diminuição dos teores protéicos no endosperma de plântulas submetidas a cinco dias de anoxia (Figura 21) não parece ter interferido na atividade amilolítica, pois foi mantida a capacidade de degradar o amido. Este resultado demonstra que, apesar da diminuição dos teores protéicos do endosperma, não houve alteração na síntese de enzimas amilolíticas no mesmo.

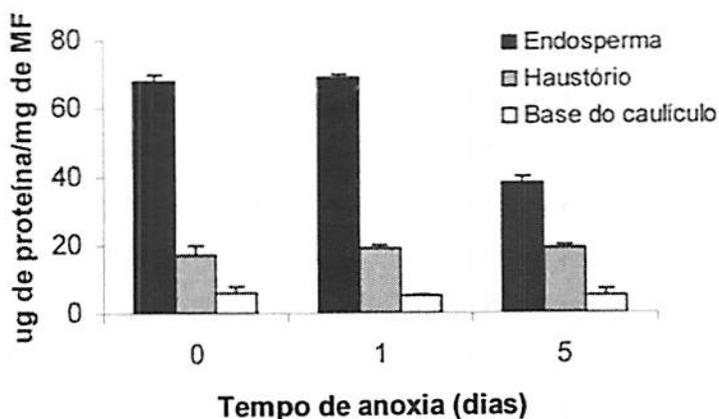


FIGURA 21 - Teores de proteína dos extratos enzimáticos do endosperma, haustório e base do caulículo de plântulas de açaizeiro aos 50 dias após a sementeira, submetidas a 0, 1 e 5 dias de anoxia.

Chandra Sekhar & DeMason (1987), em estudo comparativo da composição proteica do endosperma e embrião de *Phoenix dactylifera*, demonstraram que o endosperma continha menores quantidades de proteína (6,3%) que o embrião (22,8%), em termos de percentagem da matéria fresca. Comparando-se esses resultados com os resultados obtidos para o endosperma e o haustório do açaizeiro, nota-se uma diferença bastante significativa. Os teores de proteínas no endosperma de açaizeiro (6,8%) são compatíveis com os de *Phoenix dactylifera*, entretanto, os teores do embrião são bem inferiores. Todavia, é importante ressaltar que os autores citados trabalharam com sementes antes da germinação; no açaizeiro, trabalhou-se com o haustório de plântulas com cinquenta dias após a sementeira. Fica evidente que grande parte da proteína contida no embrião da semente do açaizeiro já foi mobilizada durante o desenvolvimento da plântula.

Após submeter os extratos do endosperma, haustório e base do caulículo a 70°C, por quinze minutos e a EDTA (1mM), notou-se que os mesmos não

provocaram uma resposta distinta daquela observada anteriormente. Observa-se que o extrato endospermico degradou mais intensamente o meio de amido, independentemente do tratamento anóxico aplicado (Figura 22).

O tratamento com 70°C não provocou uma diminuição da atividade amilolítica, o que era esperado caso uma β -amilase estivesse presente, pois alguns trabalhos citam que a aplicação desse tratamento elimina a ação dessa enzima e de uma possível fosforilase (Juliano & Varner, 1969; Yomo & Varner, 1973 e Swain & Dekker, 1966). Nolan (1984) relata uma significativa inibição da atividade da α -amilase por etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração de 1mM. Os extratos submetidos ao EDTA (Figura 24– EFG, 1 e 2) não parecem ter perdido a capacidade de degradar o amido. É provável que a α -amilase do açaizeiro não seja susceptível à ação do EDTA

Alguns trabalhos citam que a α -amilase é a principal enzima de degradação do amido em cereais (Perata et al., 1992; Guglielminett et al., 1995), sendo sintetizada de novo, após embebição. A β -amilase é conhecida como presente em sementes secas e ativada após a embebição. Contudo, os resultados da avaliação qualitativa da atividade amilolítica em sementes e plântulas de açaizeiro são fortes evidências de que a principal enzima de degradação do amido é a α -amilase, independente de estarem ou não sob anoxia. Mostram também, que a atividade amilolítica não cessou após a anoxia, tendo um comportamento semelhante ao arroz. Entretanto, diferentemente do arroz, a atividade da α -amilase é pré-existente em sementes de açaizeiro.

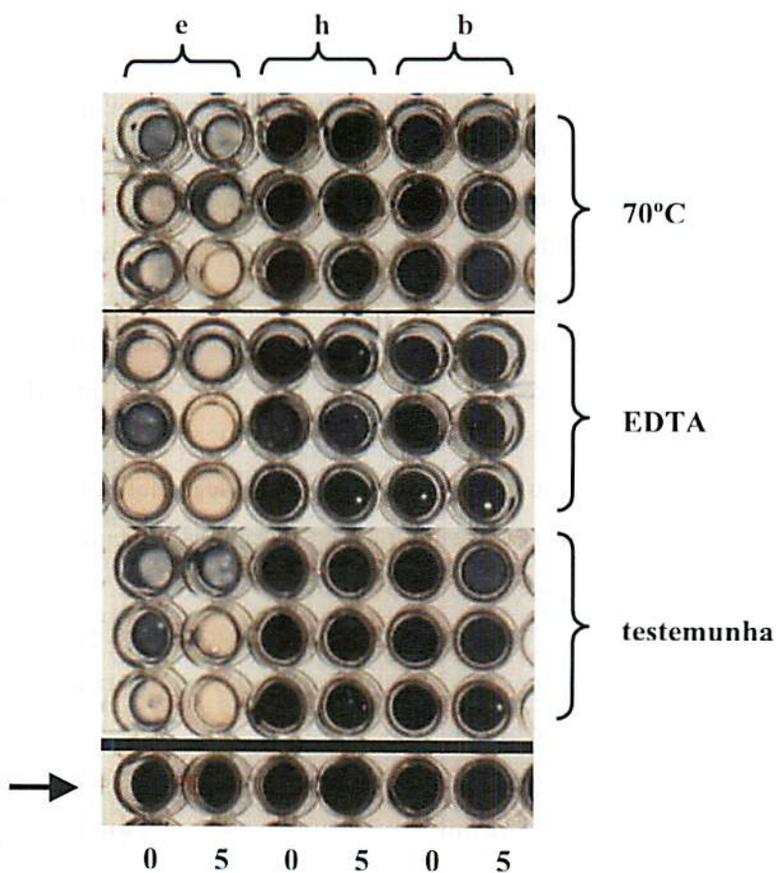


FIGURA 22 - Atividade amilolítica de extratos do endosperma (e), haustório (h) e base do caulículo (b), após 0 e 5 dias de anoxia, submetidos a 70°C, por 15 minutos; EDTA (1mM) e testemunha, (→- sem extrato).

A focalização isoeétrica de enzimas amilolíticas detectou a presença de apenas uma isoenzima, provavelmente α -amilase, haja vista a manutenção da atividade amilolítica após o tratamento com 70°C e demonstra uma expressão distinta de seu gene nos tecidos avaliados (Figura 23). No endosperma, a banda se manteve desde o tempo zero (normoxia) até cinco dias de anoxia, entretanto, na base do caulículo, a banda enzimática foi diminuindo com o tempo de

aplicação da anoxia e, no haustório, notou-se o inverso do ocorrido na base do caulículo, apresentando um aumento considerável após cinco dias de anoxia. Estes resultados parecem indicar que o haustório – tecido que acumula grande quantidade de amido a partir da degradação do amido e da manana do endosperma – desempenha um papel importante na manutenção do fluxo glicolítico em plântulas de açaizeiro sob anoxia. Diferentemente do açaizeiro, sementes de arroz apresentam duas isoenzimas de α -amilase que surgem no gel somente após dois dias de embebição, principalmente no endosperma e escutelo, independente da presença ou não de oxigênio, tendo uma das isoenzimas desaparecido durante a anoxia (Perata et al., 1992).

A explicação para a presença de atividade amilolítica em sementes antes do início da embebição reside no fato de que as sementes de açaizeiro são recalcitrantes e possuem um teor de água de 35%. Por isso, elas são metabolicamente ativas, pois, em sementes recalcitrantes, não há o período de desidratação e diminuição do metabolismo; elas são liberadas pela planta-mãe aptas para germinarem.

Comparando a capacidade germinativa de arroz e trigo em resposta à tensão de oxigênio, Taylor (1946) afirmou que a capacidade do arroz de germinar e crescer em baixas concentrações de oxigênio, capacidade essa que o trigo não possui, é decorrente do fato de o arroz apresentar um sistema fermentativo altamente funcional. Alguns trabalhos (Al-Ani et al., 1985; Raymond, Al-Ani & Pradet, 1985) têm reforçado esta idéia. Ricard et al. (1991) mostraram a indução de sacarose sintase em arroz sob anoxia, especulando que o início do metabolismo fermentativo pode aumentar a demanda por açúcares, e que em plântulas de arroz ainda presas às sementes, contendo reservas amilíferas, o amido das mesmas permite a manutenção de um metabolismo ativo durante a anaerobiose.

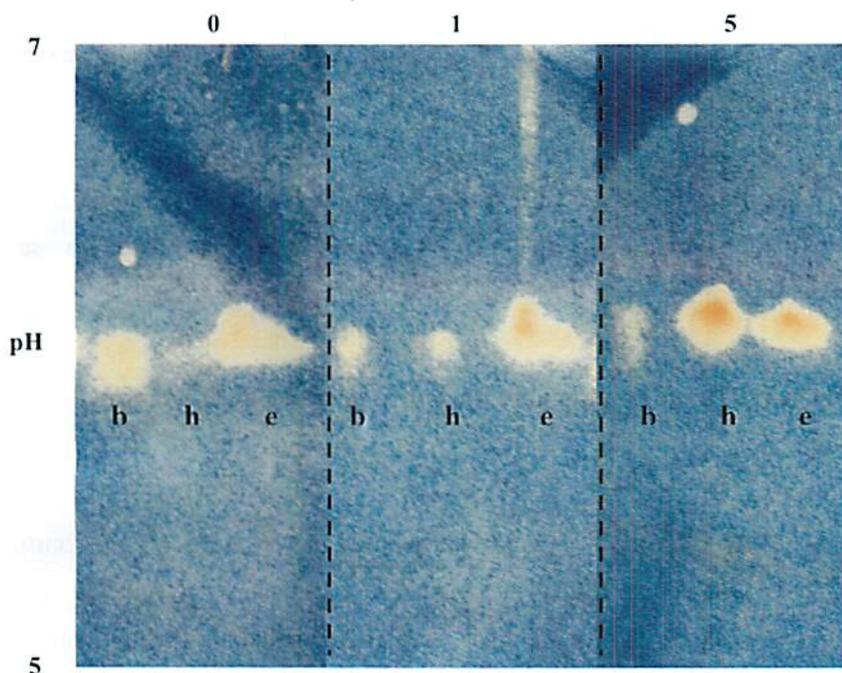


FIGURA 23 - Focalização isoelétrica de enzimas amilolíticas da base do caulículo (b), haustório (h) e endosperma (e) de plântulas de açaizeiro submetidas a 0, 1 e 5 dias de anoxia.

Alguns trabalhos têm sugerido que o aumento da atividade de α -amilase em plântulas de arroz submerso é, provavelmente, responsável pela mobilização de carboidratos, os quais são necessários à manutenção do metabolismo durante o alagamento (Raskin & Kende, 1984; Smith & Jacobsen, 1987). Os resultados de Perata et al. (1992) indicam que a anaerobiose afeta a atividade da α -amilase e α -glucosidase (maltase), e que a degradação do amido ocorre com menos intensidade. Isto ocorre apesar da alta demanda por carboidratos para o metabolismo fermentativo. É conveniente esclarecer que os primeiros autores citados trabalharam com plântulas submetidas ao alagamento, enquanto que Perata et al. (1992) trabalharam em condições anóxicas. Os resultados obtidos por Guglielminetti et al. (1995) confirmam as observações de Perata et al. (1992)

e demonstram que o arroz é capaz de sintetizar todas as enzimas necessárias à total degradação do amido (α -amilase, β -amilase, enzima desramificadora e α -glucosidase), durante a anoxia.

Em açazeiro, sob anoxia, parece haver um aumento da atividade da α -amilase, possibilitando a degradação intensa do amido localizado no haustório e endosperma que, muito provavelmente, permite que suas plântulas se mantenham vivas até a próxima vazante.

4. 8 Atividade de endo- β -mananase durante o processo de embebição de sementes

Ao avaliar a percentagem de germinação de sementes de açazeiro concomitantemente com a atividade da enzima endo β -mananase (Figura 24-A e B), verificou-se que não houve atividade da referida enzima nas sementes antes do início da embebição, tanto no endosperma como no embrião. Contudo, no quinto dia de embebição houve atividade em dois dos seis embriões avaliados, mas em nenhum endosperma, coincidente com o início da germinação e com o final da Fase I do processo de embebição. No 10º e 15º dia observou-se atividade em todos os endospermas e embriões, entretanto, a atividade no endosperma restringiu-se às proximidades do local em que o haustório estava localizado, antes da retirada do mesmo do endosperma (Figura 24-A e B). O surgimento da atividade da endo β -mananase a partir do quinto dia, somente no haustório, confirma a afirmação de Bewley & Black (1985) de que a hidrólise dos polissacarídeos de parede do endosperma de *Phoenix dactylifera* é decorrente da liberação de exoenzimas excretadas pelo haustório.

A pré-existência da atividade amilolítica em sementes antes da semeadura e a síntese *de novo* da endo β -mananase a partir do quinto dia de embebição sugerem que o amido é a reserva usada pelas sementes de açazeiro

durante o período pré-germinativo, haja vista ser uma semente recalcitrante e metabolicamente ativa. A recalcitrância de sementes é muito comum em espécies tropicais, pois, em um habitat úmido não há necessidade de um período de dormência, visto que as condições são sempre apropriadas para a germinação.

Não houve atividade da endo- β -mananase no endosperma e no haustório de plântulas de açaizeiro com 50 dias após a semeadura, submetidas a um e cinco dias de anoxia (Figura 25). Contudo, tanto o haustório como o endosperma, de plântulas em condições aeradas, apresentou atividade, porém, a atividade do haustório foi mais significativa que a do endosperma. Este resultado comprova que a endo- β -mananase não é sintetizada durante a anaerobiose e parece ser inédito, pois não consta na literatura nenhum trabalho em que se avaliou a atividade da referida enzima sob condições de anoxia.

A inativação da síntese de endo β -mananase durante a anoxia é uma estratégia interessante, pois sua síntese e excreção, a partir do haustório, é um processo que demanda muita energia. A presença de atividade da endo β -mananase no endosperma das sementes de açaizeiro pode ser decorrente de uma contaminação a partir de material do haustório, pois, neste estágio do desenvolvimento plantular, o haustório já se infiltrou em grande parte do endosperma, tornando difícil a retirada de amostras de endosperma sem a interferência de possíveis resíduos do haustório.

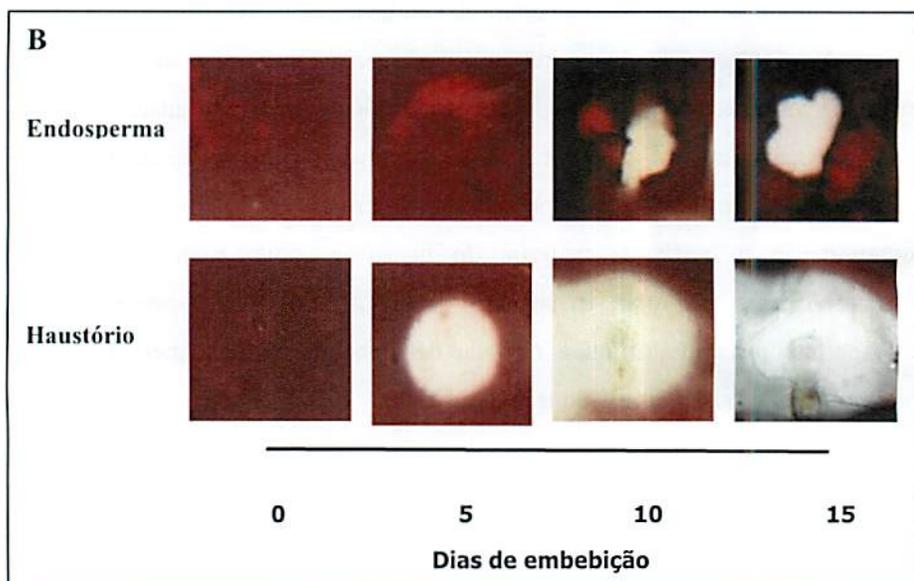
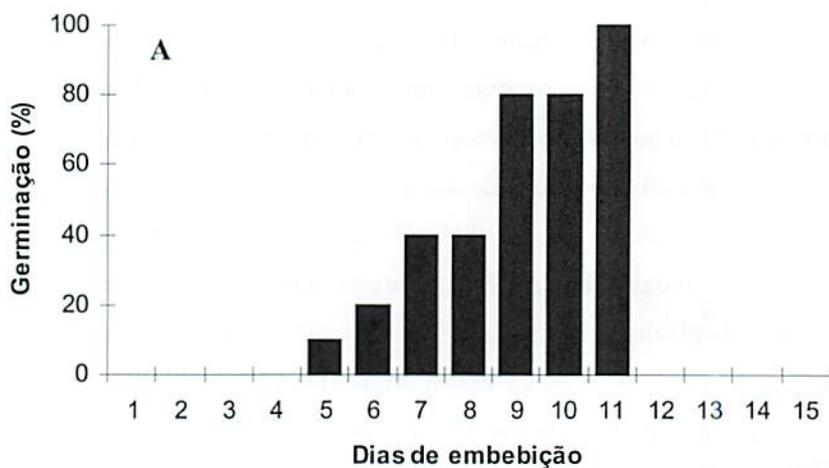


FIGURA 24 – (A) Percentagem de germinação de sementes de açaizeiro. (B) “Tissue print” de endo β -mananase em sementes de açaizeiro após 0, 5, 10 e 15 dias de embebição, no haustório e no endosperma. As regiões esbranquiçadas ocorreram exatamente na porção do endosperma em que estava localizado o embrião.

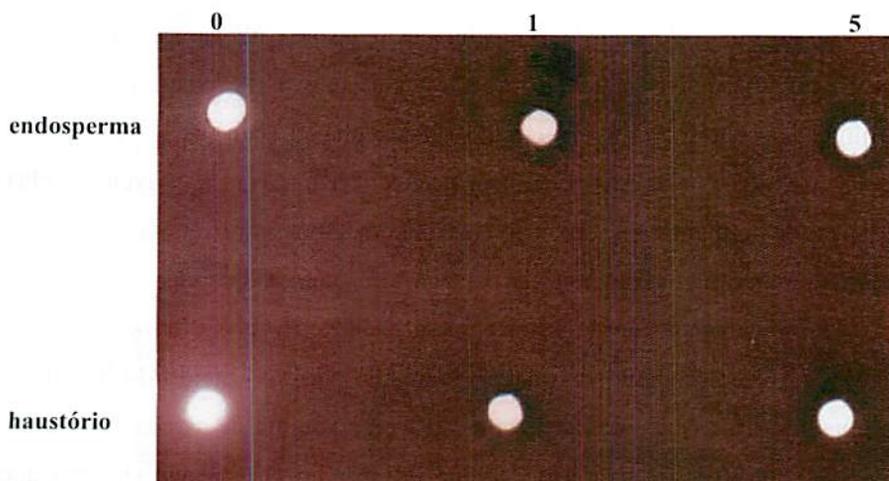


FIGURA 25 - Avaliação qualitativa da atividade de endo- β -mananase no endosperma e haustório de plântulas de açaizeiro, submetidas a 0, 1 e 5 dias de anoxia. A atividade da endo- β -mananase é caracterizada pela formação de um anel esbranquiçado na periferia dos orifícios do gel de agarose. Houve atividade somente nos extratos do endosperma e haustório de plântulas não submetidas à anoxia, tendo, no haustório, essa atividade sido visivelmente mais expressiva.

4.9 A estratégia de sobrevivência do açaizeiro ao estresse anóxico

A análise de todos os resultados obtidos confirma que o açaizeiro parece possuir uma estratégia de tolerância à anoxia bem característica. Esta espécie apresenta dois tipos de carboidratos de reserva em suas sementes: amido e manana. Durante o processo germinativo aerado, degrada tanto amido quanto manana, entretanto, durante a anoxia, não é capaz de degradar manana, conforme os dados da atividade da endo- β -mananase comprovaram, mas continua degradando o amido acumulado no endosperma, na base do caulículo e no haustório, pois a atividade amilolítica nesses tecidos é mantida durante a anoxia. Caso a anoxia se estenda por muito tempo e de maneira constante, há a

degradação do amido até seu esgotamento, acompanhado da morte da semente e/ou plântula. Contudo, por ser uma palmeira de ocorrência generalizada no estuário do rio Amazonas, principalmente em solos de várzea, sujeitos ao alagamento diário, o estresse anóxico não é constante, mas oscilatório, conforme o ritmo das marés. Por isso, durante a maré alta, o açazeiro deve degradar apenas o amido, pelas rotas etanólica e láctica (Neto, Alves & Oliveira, 1995), suficiente para manter-se vivo, sem crescimento. Após a anoxia, na maré baixa, aciona o processo degradativo da manana e mantém a degradação do amido, agora aerobicamente, capaz de sintetizar suficiente energia e intermediários que promovem o crescimento da plântula, repondo parte do amido do haustório. Depois de vários ciclos de enchente e vazante, sinônimo de parada e retomada de crescimento, respectivamente, atinge um estágio de desenvolvimento que permite que suas folhas alcancem a fase gasosa, mesmo durante o nível máximo da coluna d'água. A partir desse ponto, utiliza um mecanismo anatômico de escape da anoxia, seu sistema constitutivo de formação de aerênquimas (Neto, Alves & Oliveira, 1995), para conseguir transportar oxigênio até os tecidos submersos, mantendo a respiração aeróbica.

5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a tolerância à anoxia de sementes e plântulas de açaizeiro está relacionada com a manutenção da atividade amilolítica;
- a enzima α -amilase é pré-existente em sementes de açaizeiro;
- a enzima endo- β -mananase não é sintetizada durante a anoxia;
- a enzima endo- β -mananase é sintetizada *de novo* em sementes de açaizeiro;
- o haustório é o sítio inicial de síntese da endo- β -mananase em sementes de açaizeiro.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M. O. **Morfo-anatomia da semente, germinação e plântula de Euterpe precatoria Mart. (açai-solteiro)**. 1998. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- ALANG, Z. C.; MOIR, G. F. J.; JONES, L. H. Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of Botany*, London, v. 61, n. 2, p. 261-269, Feb. 1988.
- AL-ANI, A.; BRUZAU, F.; RAYMOND, P.; SAINT. GES, V.; LEBLANC, J. M.; PRADET, A. Germination, respiration, adenylate energy change of seeds at various oxygen pressures. *Plant Physiology*, Rockville, v. 79, n. 3, p. 85-980, Nov. 1985.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574 p.
- ALPI, A.; BEEVERS, H. Effects of O₂ concentration on rice seedlings. *Plant Physiology*, Rockville, v. 71, n. 1, p. 30-34, Jan. 1983.
- AMARAL, J. L.; ADIS, J.; PRANCE, G. T. On the vegetation of a sazonal mixedwater forest near Manaus, Brazilian Amazonia. *Amazoniana*, Manaus, v. 14, n. 3/4, p. 335-347, Apr. 1997.
- ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M. B. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Botanica Néerlandica*, Oxford, v. 43, n. 4, p. 307-358, Dec. 1994.
- ASHFORD, A. E.; GUBLER, F. Mobilization of polysaccharide reserves from endosperm. In: MURRAY, D. R. (Ed.). **Seed physiology: germination and reserve mobilization**. Sydney: Academic Press, 1984. p. 117-162.
- AYRES, J. M. **As matas de várzea do Mamirauá: médio rio Solimões**. Brasília: CNPq/Sociedade Civil Mamirauá, 1993. 123 p.
- BARCLAY, H. M.; CRAWFORD, R. M. M. Plant growth and survival under strict anaerobiosis. *Journal of Experimental Botany*, Cambridge, v. 33, n. 134, p. 541-549, 1982.
- BAYER, C.; APPEL, O. Occurrence and taxonomic significance of ruminant endosperm. *Botanical Review*, Bronx, v. 62, n. 4, p. 301-310, Oct./Dec. 1996.

BERTANI, A.; BRAMBILLA, I.; MENEGUS, F. Effect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate and fate of fermentation products. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 31, n. 120, p. 325-331, 1980.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and Biochemistry of seeds**. New York: Springer-Verlag, 1978.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1985. 367p.

BEWLEY, J. D.; REID, J. S. G. Mannans and glucomannans. In: DEY, P. M.; DIXON, R. A. (Ed.). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic Press, 1985. p.

BOESEWINKEL, F. D.; BOUMAN, F. **Embryology of Angiosperms**. In: JOHRI, B. M. (Ed.). Berlin: Springer, 1984. p. 567-610.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BUCHER, M.; KUHLEMEIER, C. Long-term anoxia tolerance: multilevel regulation of gene expression in the amphibious plant *Acorus calamus* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 2, p. 441-448, Oct. 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 52-108.

CHANDRA SEKHAR, K. N.; DEMASON, D. A. Identification and immunocytochemical localization of α -galactosidase in resting and germinated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. **Planta**, Berlin, v. 181, n. 1, p. 53-61, Apr. 1990.

CHANDRA SEKHAR, K. N.; DEMASON, D. A. Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds: a comparative study of endosperm vs. embryo. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 75, n. 3, p. 323-329, Mar. 1987.

CHOUREY, P. S.; TALIERCIO, E. W.; KANE, E. J. Tissue-specific expression and anaerobically induced posttranscriptional modulation of sucrose synthase



genes in *Sorghum bicolor* M. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 2, p. 485-490, June 1991.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. 747 p.

CRAWFORD, R. M. M.; JAMES, E. K. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lótus* species under flooded conditions. **Journal of Experimental Botany**, Columbus, v. 49, n. 320, p. 599-609, Mar. 1998.

DASSANAYAKE, M. D.; SIVAKADACHCHAN, B. Germination and seedling of *Borassus flabellifer* L. **Ceylon Journal Science**, Colombo, v. 10, n. 2, p. 05, 1973.

DEMASON, D. A.; SEKHAR, K. N. C.; HARRIS, M. Endosperm development in the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) (Arecaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 76, n. 9, p. 1255-1265, Sept. 1989.

DEMASON, D. A.; SEXTON, R.; GORMAN, M.; REID, J. S. G. Structure and biochemistry of endosperm breakdown in date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds. **Protoplasma**, Vienna, v. 126, n. 3, p. 159-167, 1985.

DEMASON, D. A.; SEXTON, R.; REID, J. S. G. Structure, composition and physiological state of the endosperm of *Phoenix dactylifera* L. **Annals of Botany**, London, v. 52, n. 1, p. 71-80, 1983.

DEMASON, D. A.; THOMSON, W. W. Structure and ultrastructure of the cotyledon of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Botanical Gazete**, Chicago, v. 142, n. 3, p. 320-328, 1981.

DE PAULA, J. E. Anatomia de *Euterpe oleracea* Mart. (Palmae da Amazônia). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 5, n. 3, p. 265-278, dez. 1975.

DREW, M. C. Sensing soil oxygen. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 681-693, Sept. 1990.

DREW, M. C. Soil aeration and plant root metabolism. **Soil Science**, Baltimore, v. 154, n. 4, p. 259-268, Oct. 1992.

DREW, M. C.; LYNCH, J. M. Soil anaerobiosis, microorganisms and root function. **Annual Review Phytopathology**, Palo, Alto, v. 18, p. 37-66, 1980.

DUSS, F.; BRÄNDLE, R. Flooding tolerance in bulrush (*Schoenoplectus lacustris* L. Palla). V. Synthesis of different fermentation products and transport substances in the rhizome tissue under oxygen deficit. *Flora*, Jena, v. 172, n. 3, p. 217-222, 1982.

ERDMANN, B.; WIEDENROTH, E. M. Changes in the root system of wheat seedlings following anaerobiosis. III. Oxygen concentration in the roots. *Annals Botany*, London, v. 62, n. 5, p. 277-286, 1988.

ESSIG, F. Trends of specialization in the palm pericarp. In: HENDERSON, A.; BORCHSENIUS, F. (Ed.). *Evolution, variation, and classification of palms*. New York: Botanical Garden, 1999. p. 73-77. (Memoirs of the New York Botanical garden ; v. 83).

GATIN, C. L. Recherches sur la germination des palmiers. *Annales Sciences Naturelles Serie Botanica*, Paris, v. 9, n. 3, p. 191-314, 1906.

GLASSMAN, S. F. A. *Revision of B. E. DAYL GRE'F: Index of American Palms*. Germany: Leutershausen Starub & Cramer, 1972. 294 p.

GOOD, A. G.; PAETKAU, D. H. Identification and characterization of a hypoxically induced maize lactate dehydrogenase gene. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 693-697, July 1992.

GUGLIELMINETTI, L.; PERATA, P.; ALPI, A. Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiology*, Rockville, v. 108, n. 2, p. 735-741, June 1995a.

GUGLIELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J.; PERATA, P.; ALPI, A. Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. *Plant Physiology*, Rockville, v. 109, n. 3, p. 1069-1076, Nov. 1995b.

HACCIUS, B. M.; KELARA, V. J. P. Embryo development in *Cocos nucifera* L.: a critical contribution to a general understanding of palm embryogenesis. *Plant Systematics Evolution*, Vienna, v. 132, p. 91-106, 1979.

HALMER, P. The mobilization of storage carbohydrates in germinated seeds. *Physiologie Végétale*, Paris, v. 23, n. 1, p. 107-125, 1985.

HALMER, P.; BEWLEY, J. D. Control by external and internal factors over the mobilization of reserve carbohydrates in higher plants. In: LOEWUS, F. A.;

RICARD, B.; RIVOAL, J.; SPITERI, A.; PRADET, A. Anaerobic stress induces the transcription and translation of sucrose synthase in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 3, p. 669-674, Mar. 1991.

ROBERTS, J. K. M.; CALLIS, J.; JARDETZKY, O.; WALBOT, V.; FREELING, M. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, Washington, v. 81, n. 19, p. 6029-6033, 1984a.

ROBERTS, J. K. M.; CALLIS, J.; WEMMER, D.; WALBOT, V.; JARDETZKY, O. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia. **Proceedings of the National Academic Science of United State of America**, Washington, v. 81, n. 11, p. 3379-3383, 1984b.

SAGLIO, P. H.; RAYMOND, P.; PRADET, A. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia: control by soluble sugars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, n. 6, p. 1053-1057, 1980.

SIEBEL, H. N.; VanWIJK, M.; BLOM, C. W. Can tree seedlings survive increased flood levels of rivers? **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 219-230, June 1998.

SIMPSON, B. B.; OGORZALY, M. C. **Economic botany: plants in our world**. 2. ed. MacGraw-Hill, 1995. 742 p.

SMITH, M. A.; JACOBSEN, H. K. Amylase activity and growth in internodes of deep water rice. **Planta**, Berlin, v. 172, n. 1, p. 114-118, Sept. 1987.

STORTI, E. F. Biologia floral de *Mauritia flexuosa* Lin. Fil. , na região de Manaus, AM, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 4, p. 371-381, dez. 1993.

STEINMANN, F.; BRÄNDLE, R. Carbohydrate and protien metabolism in the rhizoms of the bulrush (*Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla) in relation to natural development of the whole plant. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 19, n. 1/2, p. 53-63, 1984.

SUGIMURA, Y.; MURAKAMI, T. Struture and function of the haustorium in germinating coconut palm seed. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tsukuba, v. 24, n. 1, p. 1-14, July 1990.

SUMMERS, J. E.; JACKSON, M. B. Anaerobic promotion of stem extension in *Potamogeton pectinatus*: roles for carbon dioxide, acidification and hormones. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v. 96, n. 4, p. 615-622, Apr. 1996.

SWAIN, R. R.; DEKKER, E. E. Sed germination studies II. Pathways for starch degradation in germinating pea seedlings. **Biochimica Biophysica Acta, Paris**, v. 122, n. 1, p. 87-100, 1966.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAKEUCHI, K. Amino acids in the endosperm of some Amazonian Palms. **Journal of the College of Arts and Sciences-Chiba University, Chiba**, v. 3, n. 3, p. 321-325, 1961.

TALIERCIO, E. W.; CHOUREY, P. S. Post-Transcriptional control of sucrose synthase expression in anaerobic seedlings of maize. **Plant Physiology, Rockville**, v. 90, n. 4, p. 1359-1364, Aug. 1989.

TANG, Z. C.; KOZLOWSKI, T. T. Water relations, ethylene production, and morphological adaptation of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to floodings. **Plant and Soil, Dordrecht**, v. 77, n. 2/3, p. 183-192, 1984.

TAYLOR, D. L. Influence of oxygen tension on respiration, fermentation and growth in wheat and rice. **American Journal of Botany, Columbus**, v. 29, p. 721-738, 1946.

TEXEIRA, J. B.; SÖNDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and Organ Culture, Amsterdam**, v. 34, n. 3, p. 227-233, Sept. 1993.

THISELTON-DYER, W. T. Morphological notes. XII. Germination of the double coconut. **Annals of Botany, London**, v. 24, p. 223-230, 1910.

TOMLINSON, P. B. **Anatomy of the Monocotyledons-II. Palmae**. London: Oxford University Press, 1961. 440 p.

TOMLINSON, P. B. Essays on the morphology of palms. **Principes, London**, v. 4, n. 1, p. 56-61, 1960.

TOMLINSON, P. B. **The structural biology of palms**. Oxford: Clarendon Press, 1990. 460 p.

UHL, N. W.; DRANSFIELD, J. **Genera Palmarum**. Lawrence, Kansas: Allen Press, 1987. 610 p.

VARTAPETIAN, B. B.; ANDREVA, I. N.; KOZLOVA, G. I.; AGAPOVA, L. P. Mitochondrial ultrastructure in roots of mesophyte and hydrophyte at anoxia and glucose feeding. **Protoplasma**, Vienna, v. 93, n. 3, 243-256, 1977.

WATERS, I.; KUIPER, P. J. C.; WATKIN, E.; GREENWAY, H. Effectes of anoxia on wheat seedlings. I. Interaction between anoxia and other environmental factors. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 244, p. 1427-1435, Nov. 1991a.

WATERS, I.; MORRELL, S.; GREENWAY, W.; COLMER, T. D. Effectes of anoxia on wheat seedlings. II. Influence to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 244, p. 1437-1447, Nov. 1991b.

WEBB, T.; ARMSTRONG, W. The effect of anoxia and carbohydrates on the growth and viability of rice, pea and pumpkin roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n. 142, p. 579-603, 1983.

WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1997. 424 p.

YOMO, H.; VARNER, J. E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas. **Plant Physiology**, Rockville, v. 51, n. 4, p. 703-408, 1973.

ZAMBOU, K.; SPYROPOULOS, C. G. D-manose uptake by fenugreek cotyledons. **Planta**, Berlin, v. 179, n. 3, p. 403-408, Oct. 1999.