

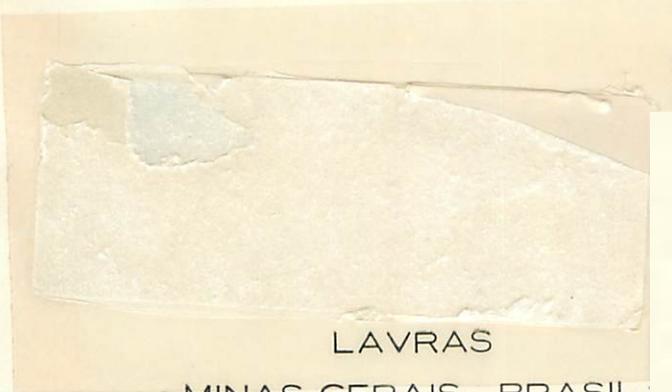
MARCO ANTÔNIO MENEZES NETO

INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO SOBRE A  
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS  
ÁLCOOL DESIDROGENASE E LACTATO DESIDROGENASE  
EM AÇAÍ (*Euterpe oleracea* Mart.)

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do  
curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de con-  
centração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título  
de «MESTRE».

Orientador:

Prof. Dr. José Donizeti Alves



LAVRAS

MINAS GERAIS BRASIL

1994

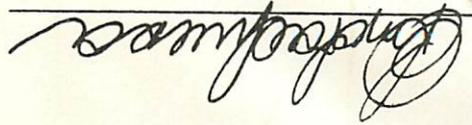
MARCO ANTÔNIO MENEZES NETO

INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO SOBRE A GERMINAÇÃO,  
CRESCIMENTO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALCOOL DESIDROGENASE E  
LACTATO DESIDROGENASE EM AÇAI (*Euterpe oleracea* Mart.)

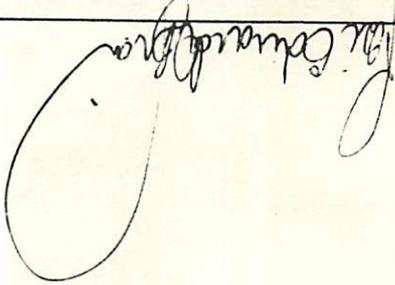
Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do  
curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de  
concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do  
título de "MESTRE".

APROVADA em 30 de março de 1994.

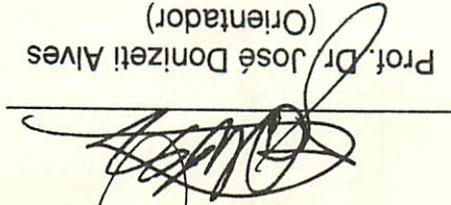
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira



Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Prof. Dr. José Donizeti Alves  
(Orientador)



Aos meus pais Juracy Sá Neto e Ruth Menezes Neto

Aos meus irmãos Marcus Vinicius Menezes Neto e Márcia Menezes Neto

A minha avó Risoleia Pessoa Menezes

A minha amada esposa, Rejane Ferreira de Souza Neto

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais e irmãos pelo constante incentivo, confiança e apoio.**

**À minha esposa Rejane Ferreira de Souza Neto, pelo grande amor, dedicação, apoio, confiança e valiosa ajuda durante todo o curso.**

**Ao professor José Donizeti Alves pela orientação, sugestões, apoio, paciência, dedicação, compreensão e amizade demonstradas durante a execução deste trabalho e de todo o curso.**

**Aos professores Amauri Alves de Alvarenga, Custódio Donizeti dos Santos, José Eduardo Brasil Pereira Pinto e Luiz Edson Mota de Oliveira, pelas valiosas sugestões apresentadas a este trabalho.**

**Aos pesquisadores Cláudio Serra, Olinto Gomes da Rocha e Osmar Alves Lameira, pela confiança e apoio.**

**Aos funcionários Ana Isa, Dartanhã, Evaristo e Izonel pela ajuda durante o curso.**

**Aos amigos Arie F. Blank, Maria de Fátima Arrigoni, Regina Forni, Cícero e Neri Deschamps e Valdemir Antônio Laura, pelo apoio, estímulo e ajuda nos momentos mais difíceis e pela grande amizade.**

**Aos demais colegas de curso pela agradável convivência e ajuda mútua.**

À Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, especialmente ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização do curso.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao convênio CEMIG/ESAL/FAEPE pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal pelos conhecimentos transmitidos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS .....	vii
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Influência da anaerobiose sobre a germinação de sementes .....	3
2.2. Influência da anaerobiose sobre o desenvolvimento das plantas .....	5
2.3. Influência do alagamento na formação de aerênquimas em plantas .....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Descrição e importância econômica da espécie estudada .....	11
3.2. Anaerobiose de sementes .....	11
3.3. Anaerobiose de plântulas .....	13
3.4. Extração e ensaio das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em sementes e plântulas de açaí .....	14
3.5. Formação de aerênquimas .....	15

	Página
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Efeito da anoxia sobre a germinação de sementes de açaf .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Efeito da anoxia sobre a atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em sementes de açaf .....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Efeito da anoxia sobre o desenvolvimento e atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em plântulas de açaf .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4. Efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a formação de aerênquimas em raízes de plântulas de açaf .....</b>	<b>35</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Evolução do comprimento (....) e do peso da matéria seca (—) dos embriões de sementes de açaí submetidas à anoxia (□) e aeração (○) em função do tempo de aplicação dos tratamentos. Média de três repetições .....	18
2	Desenvolvimento dos embriões de sementes de açaí ( <i>E. oleracea</i> Mart.) submetidas à diferentes tempos de aeração e anoxia .....	19
3	Porcentagem das sementes de açaí ( <i>E. oleracea</i> Mart.) germinadas nas diferentes épocas de avaliação. As épocas de avaliação referem-se ao número de dias, após a aplicação dos tratamentos aerado (A) e anóxico (B). Média de três repetições .....	20

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>4</b>	<b>Relação entre a porcentagem de germinação de sementes de açaí (<i>E. oleracea</i> Mart.), submetidas à anoxia (AN) e aeração (AE) em função do tempo de aplicação dos tratamentos. Após a aplicação dos tratamentos as sementes foram transferidas para caixas contendo vermiculita. Transcorridos 38 dias de permanência nesse substrato, avaliou-se a porcentagem de germinação. Média de três repetições ...</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Atividade da enzima Álcool Desidrogenase (ADH) em sementes de açaí (<i>E. oleracea</i> Mart.), submetidas a diferentes tempos de anoxia (□) e aeração (○). Média de três repetições .....</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em sementes de açaí (<i>E. oleracea</i> Mart.), submetidas a diferentes tempos de anoxia (□) e aeração (○). Média de três repetições .....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>Atividade da Álcool Desidrogenase (ADH) na raíz (vazio) e caulículo (cheio) de açaí (<i>E. oleracea</i> Mart.), sob aeração (círculo) e anoxia (quadrado) .....</b>	<b>30</b>

Figura	Página
8 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) na raiz (vazio) e caulículo (cheio) de açaí ( <i>E. oleracea</i> Mart.), sob aeração (círculo) e anoxia (quadrado) .....	31
9 Plântulas de açaí ( <i>E. oleracea</i> Mart.), após 16 dias sob tratamento anóxico e aerado .....	34
10 Corte transversal de ápice de raiz primária de plântulas de açaí ( <i>E. oleracea</i> Mart.) cultivadas em hidroponia sob A) aeração intermitente (2 horas.dia <sup>-1</sup> ), B) sem aeração e C) aeração constante ...	36

## RESUMO

**NETO, Marco Antônio Menezes. Influência da disponibilidade de oxigênio sobre a germinação, crescimento e atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em açaí (*Euterpe oleracea* Mart.).** Lavras: ESAL, 1994. 42p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

Objetivou-se estudar o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre alguns eventos metabólicos associados à germinação de sementes, sobrevivência de plântulas e na formação de aerênquima em raízes de plântulas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Para tanto, foram avaliados em diversos tempos de aplicação dos tratamentos aerado e anóxico, a atividade das enzimas Álcool Desidrogenase (ADH) e Lactato Desidrogenase (LDH), em sementes e plântulas, e a percentagem de germinação das sementes.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças na porcentagem de germinação das sementes entre os tratamentos, após o retorno à condições aeradas, observou-se que a condição anóxica atrasou a germinação.

---

\* Orientador: José Donizeti Alves. Membros da Banca: Luiz Edson Mota de Oliveira e José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Durante o período experimental, as curvas de atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, em sementes e plântulas, mostraram um comportamento similar entre os tratamentos. As sementes apresentaram um metabolismo anaeróbico menos ativo que o observado em plântulas. Em plântulas, observou-se que a atividade das duas enzimas (ADH e LDH), foi sempre maior nos caulículos que nas radículas e que a atividade da enzima Lactato Desidrogenase foi superior à atividade da Álcool Desidrogenase, não importando o tecido e o período avaliado. Notou-se também, que as plântulas submetidas ao tratamento anóxico não desenvolveram, mas retomaram seu desenvolvimento quando re-expostas à condição aerada.

Esses resultados demonstram que tanto sementes quanto plântulas de açaí, apresentam um elevado grau de tolerância à deficiência de oxigênio, ajustando-se metabolicamente em níveis distintos, e que as raízes de açaí não necessitam do estímulo do estresse por alagamento para a indução da formação de aerênquimas.

## SUMMARY

**NETO, Marco Antônio Menezes. Influence of oxygen availability on germination, growth and activity of the enzymes Alcohol dehydrogenase and Lactate dehydrogenase in "açai" (*Euterpe oleracea* Mart.). Lavras: ESAL, 1994. 42p. (Thesis - Master of Science in Plant Physiology).\***

The effect of oxygen availability on some metabolic events associated to the germination of seeds, survival of seedlings and formation of aerenchyma in roots of "açai" seedlings (*Euterpe oleracea* Mart.) was intended to be studied. Therefore, the activity of the enzymes Alcohol dehydrogenase (ADH) and Lactate dehydrogenase (LDH), at several times of application of the aerated and anoxical treatments in seeds and seedlings was assessed. In addition to the percentage of seed germination.

In spite of not finding differences in the percentage of seed germination between the treatments, after return to the aerated conditions, it was observed that aerobic conditions delayed germination.

During the experimental period the activity curves of the enzymes Alcohol dehydrogenase and Lactate dehydrogenase in seeds and seedlings showed a similar

---

\* Principal adviser: José Donizeti Alves. Board members: Luiz Edson Mota de Oliveira e José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

behaviour between treatments. The seeds presented a less active aerobic metabolism than the one observed in seedlings. In seedlings it was noticed that the activity of the two enzymes (ADH and LDH), has always been greater in shoots than in roots and that the activity of the enzyme Lactate dehydrogenase was superior to the activity of Alcohol dehydrogenase, not minding either the tissue or the period evaluated. It was also noticed that the seedlings subjected to the anoxical treatment did not develop, but resumed their development when re-exposed to aerated condition.

These results demonstrate that both "açai" seeds and seedlings showed a high degree of tolerance to oxygen deficiency, metabolically adjusting in different levels.

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas são as condições ambientais que podem proporcionar o alagamento do solo, gerando condições de hipoxia ou anoxia. Irrigação em solos mal drenados, inundações, elevação do nível de reservatórios hidrelétricos, entre outros, são fenômenos comuns.

No Brasil, vastas áreas estão sujeitas ao alagamento, principalmente na região norte. Falesi (1972), cita que 60.000 Km<sup>2</sup> ao longo do Rio Amazonas são intermitentemente alagados.

Em um solo alagado, os poros que anteriormente estavam ocupados pelo ar, são preenchidos por água. O pouco oxigênio retido no solo é rapidamente consumido pelas raízes das plantas ou por microorganismos (Drew e Lynch, 1980). Como a difusibilidade do oxigênio na água é muito baixa, um ambiente hipóxico ou anóxico é rapidamente gerado (Ponnamperuma, 1972).

A composição de espécies vegetais em regiões alagadas é influenciada, por fatores como freqüência, duração do alagamento e altura da coluna d'água bem como a tolerância ao alagamento de sementes e plântulas. Existem espécies que em condições de estresse gasoso, adaptam-se a nível morfo-anatômico e/ou metabólico, tornando-se tolerantes à anoxia (Drew, 1988). Anatomicamente, a tolerância à anoxia

está intimamente ligada a presença de aerênquimas (Jackson e Drew, 1984). Entretanto, acredita-se que espécies com aerênquima podem ser tolerantes ao alagamento, sem necessariamente serem tolerantes à anoxia.

Um grande número de espécies de plantas que toleram um prolongado alagamento do solo, exibem tanto estratégias metabólicas como de escape ao ambiente anóxico/hipóxico gerado por ele (Davies, 1980 e Kozlowski, 1982), sugerindo que a tolerância ao alagamento não se restringe a um único tipo de adaptação, mas a uma combinação de mecanismos adaptativos.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a influência da anoxia sobre a germinação das sementes e sobrevivência de plântulas de açai (*Euterpe oleracea* Mart.), acompanhando o comportamento das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, tentando estabelecer relações de causa e efeito entre suas atividades e o mecanismo metabólico de tolerância dessa espécie às condições de alagamento do meio em que habita, além de verificar o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre o desenvolvimento de aerênquimas em raízes de plântulas de açai.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### **2.1. Influência da anaerobiose sobre a germinação de sementes**

A anaerobiose ocorre naturalmente em sementes de algumas plantas superiores, como consequência da embebição de água durante a germinação (Aldasoro e Nicolas, 1980), variando de poucas horas à vários dias, dependendo da estrutura da semente, sem no entanto, prejudicar o processo. Com a ausência de oxigênio nas células vegetais, a cadeia de transporte de elétrons é inibida. Com isso, o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) também paraliza, haja visto o acúmulo de poder redutor na forma de  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Neste caso, a via mais importante de reciclagem do  $\text{NAD}^+$  passa a ser a via anaeróbica, culminando com a produção de etanol e lactato como produtos da atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, respectivamente, e também uma pequena produção líquida de ATP, indispensável à manutenção da organização e integridade celular.

Após a emissão da radícula, rompe-se a testa, permitindo assim a oxigenação dos tecidos. Com o reestabelecimento do metabolismo aeróbico, os níveis e/ou atividades das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, caem acentuadamente e como consequência a produção de etanol e lactato.

A germinação de sementes em ambientes alagados, que na maioria das vezes caracterizam-se por serem hipóxicos, também varia entre as espécies. Sementes de *Populus deltoides*, *Salix nigra*, *Platanus occidentales* (Hosner, 1957), *Oryza sativa* e *Echinochloa crus-galli* (Vartapetian et al., 1978; Kennedy et al., 1980 e Rumpho et al., 1984), freqüentemente germinam sob alagamento; ao passo que sementes de *Nyssa aquática*, *N. silvatica* e *N. taxodium* permanecem viáveis por longos períodos de submersão em água, somente germinando quando re-expostas ao ar. Por outro lado, sementes de *Fraxinus pensylvanica*, *Acer negundo* e *Quercus shumardii* perdem sua viabilidade quando submersas por pequenos períodos de tempo (Hosner, 1957).

Sementes que conseguem germinar sob anoxia, parecem desenvolver mecanismos adaptativos a essa condição adversa. Sementes de *Echinochloa crus-galli* por exemplo, germinando sob condições de total anaerobiose, mantiveram ativo o ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs), além da rota da pentose-fosfato (Rumpho e Kennedy, 1983b). Esse processo, segundo os autores, garantiu o crescimento das plântulas, uma vez que as sementes passaram a produzir mais energia e poder redutor (NADPH), devido ao aumento da atividade metabólica, associado à mobilização de reservas. Knowles e Kennedy (1985) acrescentam ainda que a rota da pentose-fosfato, uma via alternativa na oxidação de carboidratos sob anoxia, pode levar a produção de intermediários que são utilizados na biossíntese de lipídeos. O aumento na produção de lipídeos, nessas condições, além de garantir a continuidade do metabolismo dos carboidratos, oxidando NADPH, fornece também um dos componentes para a síntese da membrana celular, os fosfolipídeos, durante o processo germinativo sob anoxia.

Segundo Kozlowski (1984), a sobrevivência das plantas que conseguem germinar sob alagamento, depende ainda da altura e duração da lâmina d'água. As espécies que conseguem germinar, têm que ser capazes de estender suas folhas até a fase gasosa, antes que suas reservas esgotem, para permitir de alguma forma a oxigenação das demais partes da planta. Neste caso, torna-se limitante a profundidade do alagamento das sementes. Quando as sementes não germinam, mas mantêm sua viabilidade, o limitante será a duração do alagamento.

Tem sido estabelecido que o valor da razão ATP/ADP ou da carga energética do adenilato, está relacionada à atividade do metabolismo energético sob hipoxia ou anoxia (Pradet e Raymundo, 1983). Geralmente, sementes que mantêm bons níveis de carga energética do adenilato sob condições anóxicas, são tolerantes. Parece haver uma estreita relação entre essa característica, a taxa de síntese de proteínas, o metabolismo do RNAm (Mocquot et al., 1981 e Aspart et al., 1983), e a composição das reservas dessas sementes. Raymond et al. (1985), relacionam essas características, demonstrando que sementes que possuem reservas amiláceas são mais eficientes que sementes ricas em lipídeos, na manutenção de uma carga energética do adenilato acima de 0,5, suficiente para manter a viabilidade das sementes.

## ***2.2. Influência da anaerobiose sobre o desenvolvimento das plantas***

Apesar do avanço no conhecimento sobre o metabolismo anaeróbico do carbono, a base bioquímica da tolerância ao estresse gasoso ainda não foi elucidada.

Sabe-se entretanto que as plantas, quando submetidas à ambientes de baixa disponibilidade de oxigênio, alteram a expressão dos genes, levando a um padrão protéico diferente (Okimoto et al., 1980). Sachs et al. (1980), cultivando milho em condições de estresse gasoso, detectaram, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a síntese de vinte polipeptídeos, os quais foram denominados de "polipeptídeos anaeróbicos". Alguns desses peptídeos, tem sido identificados como Álcool Desidrogenase (Sachs e Freeling, 1978; Ferl et al., 1980 e Lazlo e Lawrence, 1983), Piruvato Descarboxilase (Lazlo e Lawrence, 1983 e Wignarajah e Greenway, 1976), Glicose Fosfato Isomerase (Kelley e Freeling, 1984a), Aldolase (Kelly e Freeling, 1984b) e Lactato Desidrogenase (Hoffman et al., 1986).

Destaca-se a importância das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase no aumento da tolerância de plantas à hipoxia e/ou anoxia. Em milho, a hipoxia estimula a via fermentativa etanólica em raízes, aumentando sua tolerância a anaerobiose (Hole et al., 1992). O mesmo efeito foi provocado pela aplicação de ácido abscísico (ABA) em raízes de milho, pois estimulou a síntese da enzima Álcool Desidrogenase, antes do tratamento anaeróbico (Hwang e Vantoai, 1991). Da mesma forma, o pré-tratamento de plantas intactas de milho (Johson et al., 1989), e trigo (Waters et al., 1991), a baixas concentrações de O<sub>2</sub> pode aumentar a sua tolerância à anoxia. Tais resultados têm sido atribuídos pelos autores, a aumentos nas atividades das enzimas Piruvato Descarboxilase e Álcool Desidrogenase na região meristemática das raízes.

Cobb e Kennedy (1987), demonstraram que plântulas de arroz e *Echinochloa crus-galii* sobrevivem por mais tempo, sob anoxia, que plântulas de ervilha

e milho, vinculando essa maior tolerância ao fato de que nessas plântulas, a atividade da enzima Álcool Desidrogenase foi maior na parte aérea que nas raízes. Esses resultados levaram os autores a sugerirem que em espécies tolerantes à anaerobiose, a atividade da enzima Álcool Desidrogenase na parte aérea, resulta de adaptações metabólicas a essa condição.

Embora a atividade da enzima Álcool Desidrogenase não seja aparentemente requerida para o crescimento do milho em condições aeradas, Lemke-Keys e Sachs (1989) demonstraram, utilizando mutantes sem o gene para a ADH1, que a atividade dessa enzima é essencial para estender a sobrevivência dessa espécie, durante o alagamento. Resultados semelhantes foram observados em cevada (Harberd e Edwards, 1982).

Depois de um período inicial de vinte e quatro horas do início da anaerobiose, durante o qual as proteínas anaeróbicas, conhecidas também como proteínas de choque anaeróbico (ASps), são sintetizadas, retorna a síntese de proteínas aeróbicas (Kennedy et al., 1992). Embora os polissomos se dissociem em algumas espécies de plantas (Bailey-Serres e Freeling, 1990) durante a hipoxia, em outras espécies como *Echinochloa phyllopogon* (Kennedy, Rumpho e Fox, 1992) e arroz (Mocquot et al., 1981), o mesmo não ocorre nem mesmo sob condições anóxicas.

Embora a fermentação etanólica possa gerar algum ATP, em plântulas de arroz sob anoxia, parece provável que este é suplementado pela operação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Rumpho e Kennedy, 1983b). A fosforilação ao nível do substrato, no ciclo dos ácidos tricarbóxicos pode prover ATP suficiente para os

requerimentos de crescimento, enquanto que a reoxidação do  $\text{NADH} + \text{H}^+$  a  $\text{NAD}^+$  pode ocorrer através de um citocromo que utiliza um aceptor terminal de elétrons distinto do  $\text{O}_2$  (Fox, Bozarth e Kennedy, 1988). Outra possível via de reoxidação do  $\text{NADH} + \text{H}^+$  é a redução do nitrato a nitrito pela enzima redutase do nitrato. Garcia-Novo e Crawford (1973) enfatizam a importância desta via na tolerância de espécies vegetais ao alagamento. Em açaí, Pelacani (1993) observou uma tendência de maior atividade dessa enzima em raízes sob alagamento que em raízes sob condição normal de aeração.

Recentes trabalhos têm dado maior ênfase a Lactato Desidrogenase em relação a tolerância, tanto à baixa disponibilidade de oxigênio como à anoxia. Algumas espécies do gênero *Limonium*, tenderam a produzir relações lactato: etanol maiores que um. Desse lactato produzido, grande parte foi encontrada no meio de cultivo, sugerindo um mecanismo muito eficiente de eliminação desse lactato para o meio externo (Rivoal e Hanson, 1993). O trabalho de Xia e Saglio (1992) confirma o envolvimento de proteínas nessa excreção, que pode funcionar como um mecanismo de desintoxicação, induzido possivelmente durante a fase de aclimação hipóxica, impedindo assim que o pH citoplasmático atinja um nível letal.

Roberts et al. (1984), relacionaram a importância do estado energético da célula com a manutenção do gradiente de prótons ( $\text{H}^+$ ) entre o citoplasma (pH~7,4) e o vacúolo (pH~5,8), através da ação de ATPases do tonoplasto, translocadoras de prótons, as quais, presumivelmente, tem sua atividade diminuída com a queda no estado de energia celular, permitindo a liberação passiva de prótons ( $\text{H}^+$ ) até o

citoplasma. Segundo os autores, a destruição do gradiente de prótons é um dos fatores responsáveis pelo colapso celular.

### **2.3. Influência do alagamento na formação de aerênquimas em plantas**

Algumas espécies vegetais são capazes de resistir períodos de alagamento do solo, apresentando algum crescimento até mesmo quando parcialmente submersas sem mostrar nenhum sinal de estresse. Nessa espécie de plantas as raízes desenvolvem canais interconectados longitudinalmente que formam uma via de baixa resistência para difusão de oxigênio e outros gases. Esses canais são conhecidos por aerênquimas.

Um aerênquima bem desenvolvido, que é uma característica de espécies aquáticas e de regiões alagadas, facilita a difusão de oxigênio da parte aérea até as raízes (Armstrong, 1979). Em espécies comumente encontradas em regiões alagadas, como o arroz, os aerênquimas desenvolvem-se independentemente do estímulo ambiental (Jackson et al., 1985). Entretanto, em espécies como o milho, cevada, trigo e outras plantas típicas de terra firme, a formação de aerênquimas nas raízes é induzida pela deficiência de oxigênio (Taiz e Zeiger, 1991).

Em estudo recente, Jackson (1990) demonstrou que, após o estresse por alagamento, há grandes possibilidades de que hormônios de plantas estejam envolvidos no processo de formação dos aerênquimas em plantas. Há uma estreita correlação entre o desenvolvimento do aerênquima e a capacidade de plantas de habitarem locais sujeitos ao alagamento (Kawase, 1981; Justin e Armstrong, 1987).

Alguns trabalhos demonstram clara e inequivocamente a importância da baixa disponibilidade de oxigênio (hipoxia) e não sua ausência (anoxia) na formação de aerênquimas em raízes de plantas como o milho e o trigo (Drew, Jackson e Giffard, 1979; Jackson et al., 1985 e Thompson et al., 1990), haja visto que a síntese do etileno, hormônio relacionado à formação de aerênquimas em plantas, tem uma fase estimulada pela ausência ou baixa disponibilidade de oxigênio e outra fase em que o oxigênio é indispensável.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Descrição e importância econômica da espécie estudada**

*Euterpe oleracea* Mart., comumente conhecida por açáí, é uma palmeira de porte médio e de ocorrência generalizada em toda a região amazônica, notadamente em regiões pantanosas. Da parte apical de seu caule extrai-se o palmito e seus frutos são muito apreciados, pois deles preparam-se o famoso "vinho de açáí" e outros derivados.

#### **3.2. Anaerobiose de sementes**

Sementes de açáí, após serem lavadas com água destilada por duas vezes, foram submetidas aos tratamentos anóxico e aerado por 1, 2, 3, 4, 10, 15 e 20 dias, em condições de escuro a uma temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

A anoxia foi simulada colocando-se, para cada tempo de aplicação dos tratamentos, dez sementes submersas em água destilada contida em frascos de vidro com 650 mL. Em seguida, aplicou-se vácuo por duas vezes, durante 5 minutos, após o que adaptou-se na abertura dos frascos de vidro, tampa de borracha com dois

orifícios, que permitiram o borbulhamento de nitrogênio através de um tubo plástico inserido em um dos orifícios, por dois minutos, a uma vazão de  $50 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ . No final da operação os frascos foram lacrados com "parafilm".

A aeração constou do procedimento de envolver as sementes em papel para germinação, umidecido com água destilada, colocando-o em um frasco de vidro na posição vertical, no qual manteve-se, em sua base, um nível constante de 2 cm de água destilada.

Decorridos os diferentes tempos de aplicação dos tratamentos, as sementes foram transferidas para caixas contendo vermiculita, em ambiente com fotoperíodo de 12 horas, intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de  $200 \mu\text{E}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e uma temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Aos 23, 26, 29, 32, 35 e 38 dias após o início da aplicação dos tratamentos, foram realizadas avaliações da porcentagem de germinação. O delineamento experimental utilizado em todos os ensaios foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento.

Um segundo ensaio foi instalado do mesmo modo e nas mesmas condições do ensaio anterior, exceto os tempos de aplicação dos tratamentos que foram de 0, 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias e o número de sementes por frasco que foi de seis. Ao final de cada período, determinou-se o desenvolvimento dos embriões, medindo-se seu comprimento e, após secagem em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 48 horas, até peso constante, o peso da matéria seca, além da atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase.

### **3.3. Anaerobiose de plântulas**

Plântulas de açaí com idade de vinte dias após a sua emergência, foram lavadas por dez minutos com solução de hipoclorito de sódio a 0,1%, sendo em seguida submetidas aos tratamentos aerado e anóxico, durante 0, 2, 4, 8 e 16 dias.

O tratamento aerado constou do cultivo das plântulas em frascos de vidro contendo vermiculita, em um sistema aberto, a fim de permitir as trocas gasosas.

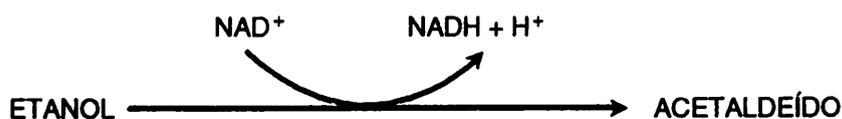
A anoxia foi simulada colocando-se para cada tempo de aplicação dos tratamentos, plântulas totalmente submersas em água destilada em frascos de vidro de 650 mL. Em seguida, aplicou-se vácuo por duas vezes, durante 5 minutos, após o que adaptou-se na abertura dos frascos de vidro uma tampa de borracha contendo dois orifícios, os quais permitiram o borbulhamento de nitrogênio através de um tudo plástico inserido em um dos orifícios por dois minutos, a uma vazão de 50 L.min<sup>-1</sup>. No final da operação, os frascos foram lacrados com "parafilm".

Os frascos foram colocados em câmara de crescimento sob temperatura de 30 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas e uma intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de 200 μE.cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições e oito plântulas por unidade experimental.

### 3.4. Extração e ensaio das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em sementes e plântulas de açaí

A extração das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase de sementes foi realizada quebrando-se as sementes em uma morsa, congelando-as em nitrogênio líquido e homogeneizando-as em um homogeneizador tipo Polytron à aproximadamente 4°C, utilizando-se uma semente para cada 5 ml de meio de extração contendo a seguinte composição em mol.m<sup>-3</sup>: Tampão Tris-HCl (pH 6,8), 50; Na<sup>+</sup>, 110; EDTA, 1; Tiamina Pirofosfato (TPP), 0,5; Mg<sup>+2</sup>, 2,5 e Ditioneitol (DTT) 2. Após a homogeneização, procedeu-se a centrifugação a 20.000 g por dez minutos, a uma temperatura de 0-4°C. Alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram adicionadas em meio de reação específico para a enzima Álcool Desidrogenase, com 3 mL de volume final, contendo a seguinte composição em mol.m<sup>-3</sup>: Tampão Tris-HCl (pH 8,9), 50; Ditioneitol (DTT), 2; NAD<sup>+</sup>, 0,25 e 100 µL de Etanol 96% e para a enzima Lactato Desidrogenase, composto de Tampão Tris HCl (pH 9,9), 50; Glicina, 100; Sulfato de Hidrazina, 5,0 e Lactato de Sódio, 60.

As atividades das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase foram determinadas quantificando-se o NADH + H<sup>+</sup> formado no sentido da seguinte reação:



Em cada meio, após 3 minutos de reação a 25°C, mediante leitura da absorbância em um espectrofotômetro a 340 nm, utilizando-se como padrão, soluções aquosas de NADH + H<sup>+</sup> variando na faixa de  $5 \times 10^{-3}$  a  $75 \times 10^{-2}$   $\mu$ moles.

A atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase foram expressas em  $\mu$ moles de NADH + H<sup>+</sup> x min<sup>-1</sup> x g<sup>-1</sup> MS. Para expressar as atividades de ambas as enzimas em termos de matéria seca, retirou-se amostras tanto de sementes quanto de raízes e caulículos, determinando-se a relação média entre o peso da matéria fresca e o peso da matéria seca.

Os procedimentos de extração e quantificação da atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase de plântulas foram idênticos aos relatados para sementes, exceto a quantidade de material vegetal fresco utilizado, que foi de 200 mg de raiz primária e caulículo retirados a partir do ápice de cada duas plântulas por frasco, macerados em almofariz com 2 mL do mesmo meio de extração utilizado para sementes. As seis plântulas restantes de cada repetição, foram transferidas para caixa plástica com vermiculita irrigadas diariamente com água destilada, sob as mesmas condições de fotoperíodo, radiação fotossinteticamente ativa e temperatura anteriormente citadas. Duas semanas após a transferência para a vermiculita, avaliou-se a sobrevivência das plântulas.

### **3.5. Formação de aerênquimas**

Plântulas no mesmo estágio de desenvolvimento do ensaio anterior foram submetidas a tratamentos que induziram diferentes níveis de disponibilidade de

oxigênio no meio de cultivo. Os tratamentos foram: a) Plantas cultivadas em hidroponia sob aeração constante; b) aeração intermitente (2 horas.dia<sup>-1</sup>) e c) sem aeração. Utilizou-se apenas água destilada para simular os diferentes níveis de disponibilidade de oxigênio, pois as plântulas ainda nutriam-se de suas sementes, não sendo necessário utilizar solução nutritiva.

Após 24, 48, 72 e 96 horas de indução dos tratamentos, foram realizados cortes anatômicos das raízes. Os cortes foram feitos manualmente, distando 1 cm do ápice da raiz primária das plântulas, utilizando-se lâmina de barbear. Posteriormente, preparou-se lâminas semipermanentes adicionando-se uma gota de água glicerinada ao corte, colocado entre a lâmina e lamínula, procedendo-se em seguida as observações da presença ou não de aerênquimas através de um microscópio óptico.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### ***4.1. Efeito da anoxia sobre a germinação de sementes de açaí***

Sementes de açaí não foram capazes de germinar durante o período de anoxia, uma vez que o crescimento do embrião, representado pelo comprimento e peso da matéria seca, não variou durante o período de aplicação dos tratamentos (Figura 1), contrastando com o crescimento dos embriões a partir do décimo quinto dia de aeração (Figura 2). No vigésimo dia de tratamento, essas duas características aumentaram, sob aeração, em mais de quatro vezes os seus valores iniciais. A ausência de crescimento dos embriões sob anoxia sugere, naquelas sementes, uma paralização da cadeia de transporte de elétrons e do ciclo do ácido tricarboxílico.

Em tecidos aclorofilados e com poucas reservas como é o caso das sementes de açaí, a paralização do metabolismo aeróbico pode levar a um déficit de energia e de metabólitos intermediários, fundamentais para a síntese de compostos essenciais à retomada de crescimento do embrião. Esta hipótese pode ser comprovada com a retomada do processo germinativo, ainda que com certo atraso, após o retorno às condições de aeração (Figura 3). Esse atraso, de maneira geral, acentuou-se com o período de tratamento anóxico, tornando-se mais evidente, a partir

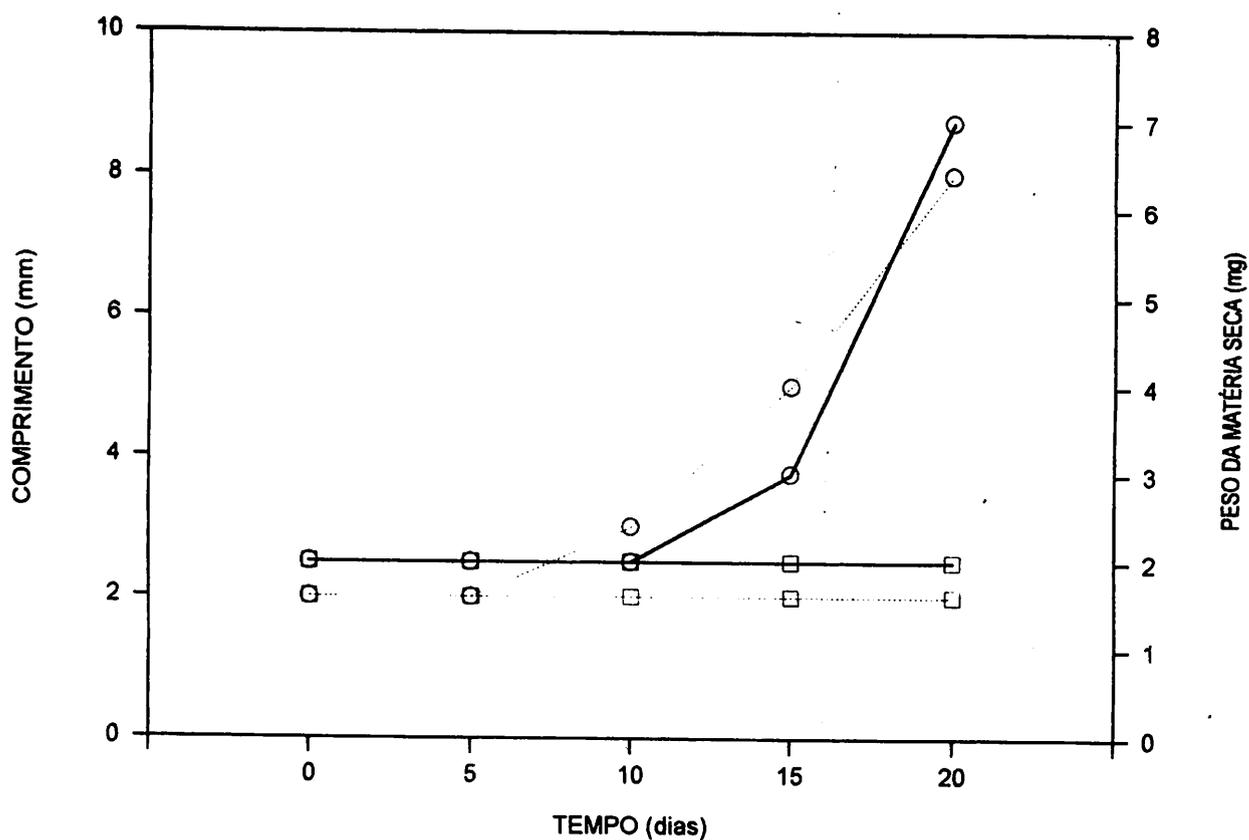


FIGURA 1. Evolução do comprimento (....) e do peso da matéria seca (—) dos embriões de sementes de açaí submetidas à anoxia (□) e aeração (○) em função do tempo de aplicação dos tratamentos. Média de três repetições.

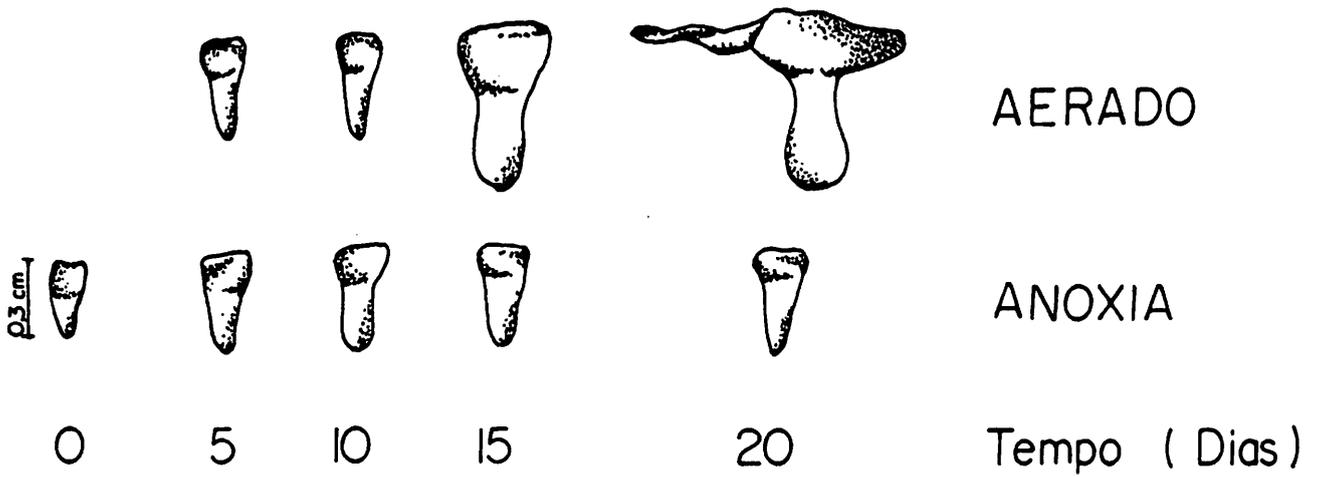


FIGURA 2. Crescimento dos embriões de sementes de açaí (*E. oleracea* Mart.) submetidas a diferentes tempos de aeração e anoxia.

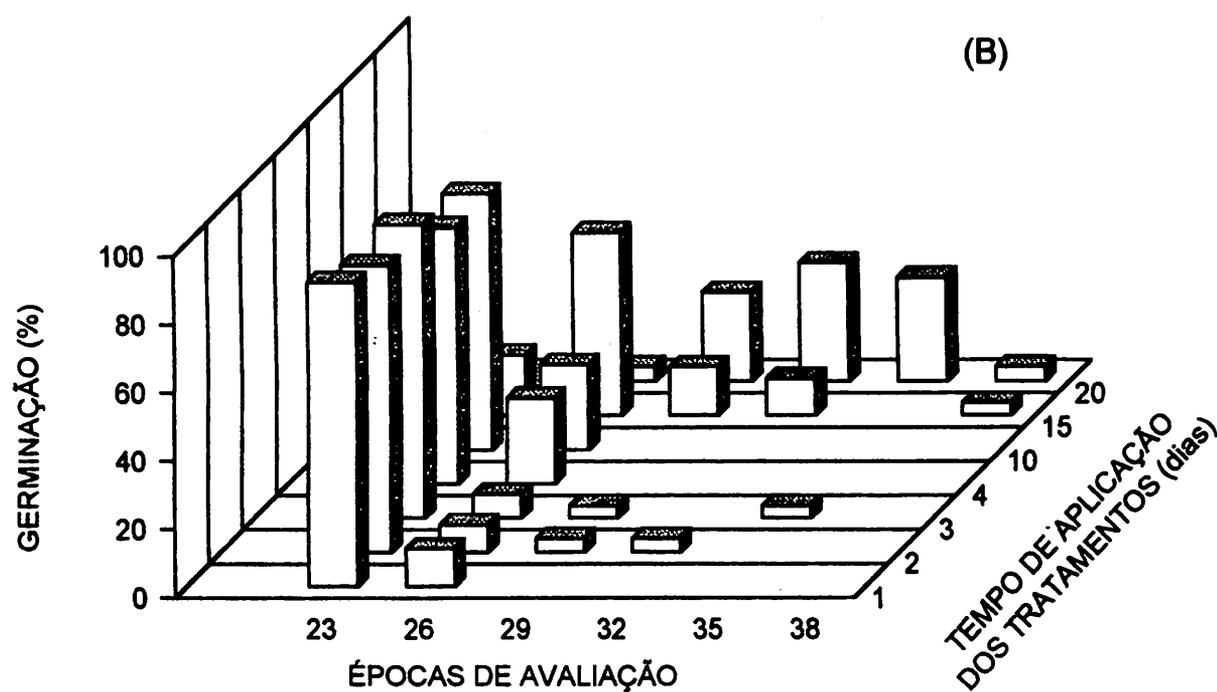
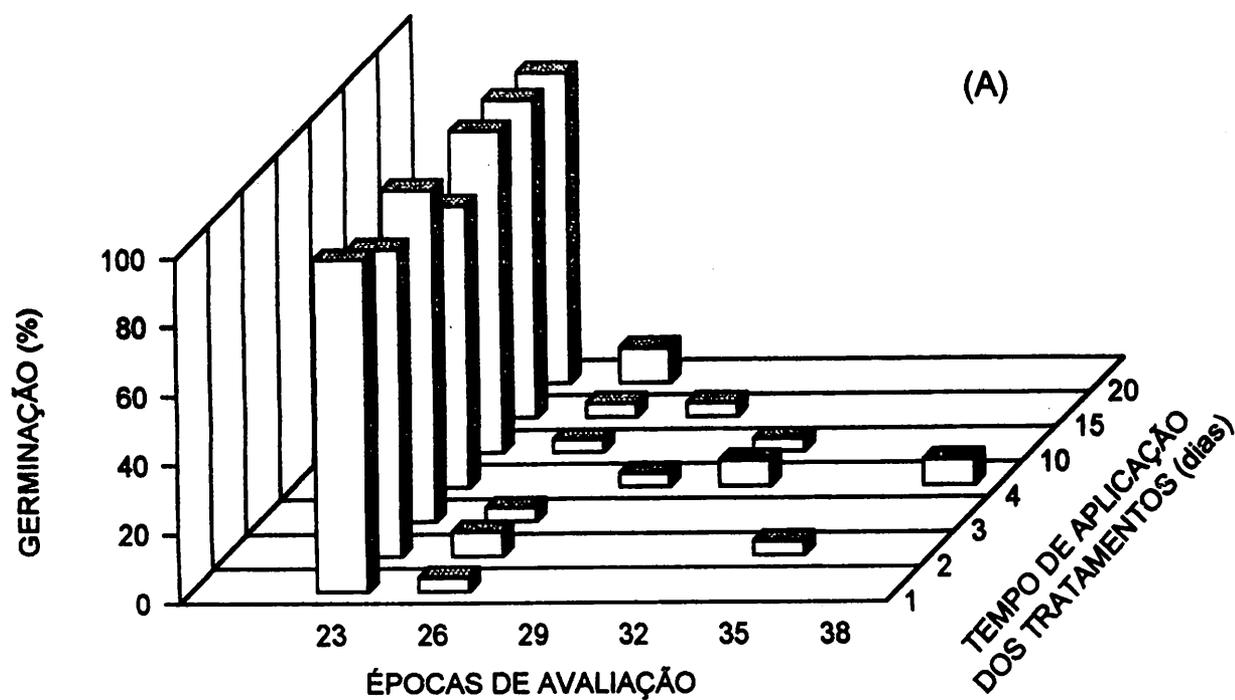


FIGURA 3. Porcentagem das sementes de açaí (*E. oleracea* Mart.) germinadas nas diferentes épocas de avaliação. As épocas de avaliação referem-se ao número de dias após a aplicação dos tratamentos aerado (A) e anóxico (B). Média de três repetições.

do décimo quinto dia. O atraso na germinação, após a retomada das condições de aeração do meio (Figura 3) representa, possivelmente, o tempo necessário à expressão das enzimas que fazem parte do metabolismo aeróbico naquelas sementes. Okimoto et al. (1980) demonstraram uma intensa redução na síntese de proteínas totais em diferentes compartimentos das sementes de milho submetidas à anoxia, quando comparadas com aquelas que estavam germinando em ambiente aerado. Segundo Sachs, Freeling e Okimoto (1980), a repressão da síntese dos "polipeptídeos aeróbicos" deve ocorrer ao nível de tradução e posteriormente ao nível de transcrição.

Concomitantemente ao desaparecimento de muitas proteínas, destaca-se o aparecimento de outras, que só se expressam sob condições de anoxia (Okimoto et al., 1980). A síntese desses "polipeptídeos anaeróbicos", segundo Schwartz (1969); Sachs, Freeling e Okimoto (1980); Sachs e Ho (1986) garante a sobrevivência dos tecidos sob esse tipo de estresse.

Observa-se entretanto, que no trigésimo oitavo dia após o início da aplicação dos tratamentos, a porcentagem de germinação das sementes submetidas previamente à anoxia em relação às aeradas, praticamente não variou (Figura 4). Esses resultados demonstram que as sementes de açaí suportam a condição de anoxia, por um período de pelo menos vinte dias, sem afetar, irreversivelmente, sua respiração.

A literatura registra somente seis espécies capazes de germinar e crescer sob condições de total anoxia. É o caso de quatro espécies do gênero *Echinochloa* (Kennedy et al., 1980; Rumpho e Kennedy, 1983a,b e Rumpho et al., 1984); arroz (*Oryza sativa*) (Avadhani et al., 1978 e Alpi e Beevers, 1983) e o legume africano

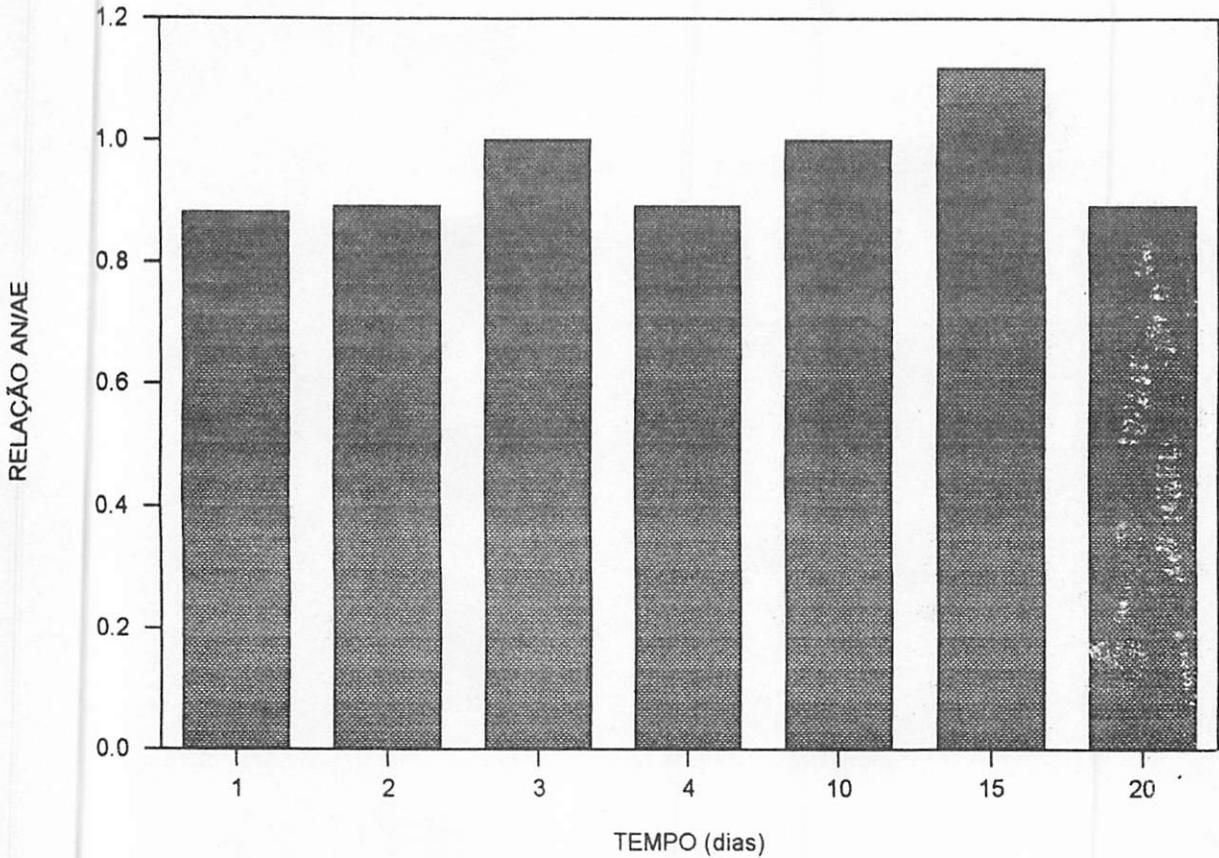


FIGURA 4. Relação entre a porcentagem de germinação de sementes de açai (*E. oleracea* Mart.), submetidas à anoxia (AN) e aeração (AE) em função do tempo de aplicação dos tratamentos. Após a aplicação dos tratamentos as sementes foram transferidas para caixas contendo vermiculita. Transcorridos 38 dias de permanência nesse substrato, avaliou-se a porcentagem de germinação. Média de três repetições.



Fig. 1A - Resultado entre a pontuação de demência no teste de água (A) e o tempo de aplicação dos tratamentos. Após a aplicação dos tratamentos, as pontuações foram transferidas para o teste de demência. Média de pontuação: 38, desvio padrão: 10,5. Média de tempo de aplicação: 0,5 min. Média de pontuação de demência: 38, desvio padrão: 10,5.

*Erythrina caffra* (Small, Potgieter e Botha, 1989). Como possíveis justificativas a essa extraordinária adaptação à anoxia, destacam-se a estabilidade das mitocôndrias (Vartapetian, Andreeva e Kozlova, 1976), o funcionamento da via oxidativa da pentose fosfato, como importante via de produção de compostos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Rumpho e Kennedy, 1983a), presença de todas as enzimas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, embora com menor atividade (Fox e Kennedy, 1991), intensa biossíntese de lipídeos (Vartapetian, Mazliak e Lance, 1978) e o nitrato como acceptor terminal de elétrons (Garcia-Novo e Crawford, 1973).

No caso do açáí, suas sementes parecem possuir um mecanismo diferente de tolerância dos citados anteriormente. Mantem-se viáveis, até que a condição ambiental proporcione um bom suprimento de oxigênio, para que o embrião possa retomar o seu crescimento a custa de metabólitos intermediários do metabolismo aeróbico.

A estratégia de tolerância à hipoxia ou anoxia é um dos fatores mais importantes na distribuição das espécies vegetais em um ecossistema sujeito ao alagamento.

A germinação de sementes, quando alagadas, só é vantajosa caso a coluna d'água seja suficientemente pequena para permitir o rápido crescimento da parte aérea até a superfície e assim melhorar as condições de oxigenação do sistema radicular. Por outro lado, o alagamento prolongado pode tornar-se letal às sementes e plantas, uma vez que poucas espécies podem resistir a uma prolongada submersão das sementes e principalmente folhas. Considerando-se as sementes de açáí, sugere-se, baseando-se nos resultados de germinação obtidos, que a duração do alagamento,

o principal fator limitante a sua sobrevivência e distribuição em habitats sujeitos ao alagamento.

#### **4.2. Efeito da anoxia sobre a atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em sementes de açaí**

As curvas de atividade da enzima Álcool Desidrogenase apresentam uma tendência de crescimento, com o tempo de imposição dos tratamentos, não diferindo entre si, durante todo o período experimental, em relação aos tratamentos aerado e anóxico (Figura 5). Resposta semelhante foi obtida por Small, Potgieter e Botha (1989) com *Erythrina caffra*.

É interessante destacar a presença de atividade da enzima durante o tempo zero de ensaio, sugerindo com isso, a existência de uma enzima do tipo constitutiva à semelhança do que foi caracterizado no trabalho de Newman e Vantoi (1992). Por outro lado, o aumento da atividade com o tempo de aplicação dos tratamentos, indica também a existência de enzimas do tipo induzida pela anoxia. Neste aspecto, Okimoto et al. (1980) mostraram que aumentos na síntese de Álcool Desidrogenase é uma resposta específica em sementes de milho expostas à condições anaeróbicas. De maneira semelhante, Kadowaki et al. (1988), estudando a indução da enzima Álcool Desidrogenase em raízes de arroz pela anaerobiose, constataram que o aumento da atividade era provocado pela "síntese de novo" e não através da ativação de enzimas inativas pré-existentes.

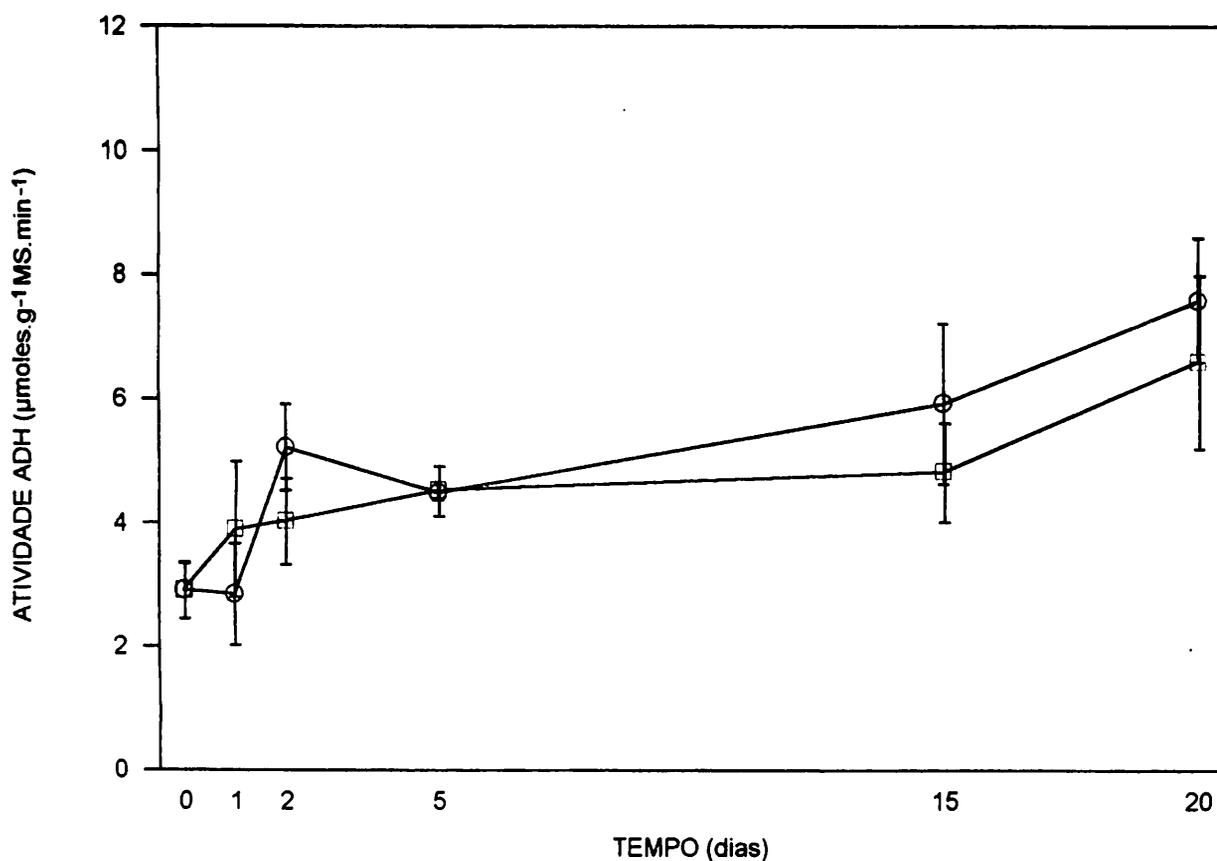


FIGURA 5. Atividade da enzima Álcool Desidrogenase (ADH) em sementes de açai (*E. oleracea* Mart.), submetidas a diferentes tempos de anoxia (□) e aeração (○). Média de três repetições.

Aumentos na síntese da enzima Álcool Desidrogenase em resposta à anoxia, tem sido caracterizados de maneira geral, como uma defesa da planta a esse tipo de estresse (Lemke-Keyes e Sachs, 1989 e Harberd e Edwards, 1982), haja visto sua contribuição na reciclagem do  $\text{NAD}^+$  e conseqüente produção de energia via glicólise.

Outro fato importante a ser destacado é a tendência de superioridade na atividade da Álcool Desidrogenase nas sementes aeradas, observada a partir do décimo quinto dia (Figura 5). Essa tendência de aumento, possivelmente, deve-se à contribuição do embrião dessas sementes que, a partir desse período, passou a desenvolver-se ativamente (Figuras 1 e 2) e com isto, sintetizando novas moléculas de enzima. Essas enzimas poderiam ser do tipo constitutivas, uma vez que parece ser característica das sementes de açaí. Alternativamente, poderiam ser também do tipo induzida já que, de um modo geral, as sementes experimentam um certo período de hipoxia e/ou anoxia natural, durante a fase de embebição da germinação.

A enzima Lactato Desidrogenase apresentou um comportamento similar ao da Álcool Desidrogenase, tanto para as sementes aeradas quanto anóxicas (Figura 6).

Os dados relativos a essas duas enzimas em sementes de açaí, estão de acordo com a afirmação de Hanson e Jacobsen (1984) sobre a capacidade de expressão constitutiva e indutivas dessas enzimas em camada de aleurona de cevada. Esses autores destacam a importância da Lactato Desidrogenase constitutiva na tolerância das plantas à deficiência de oxigênio no meio, pois essa enzima também é

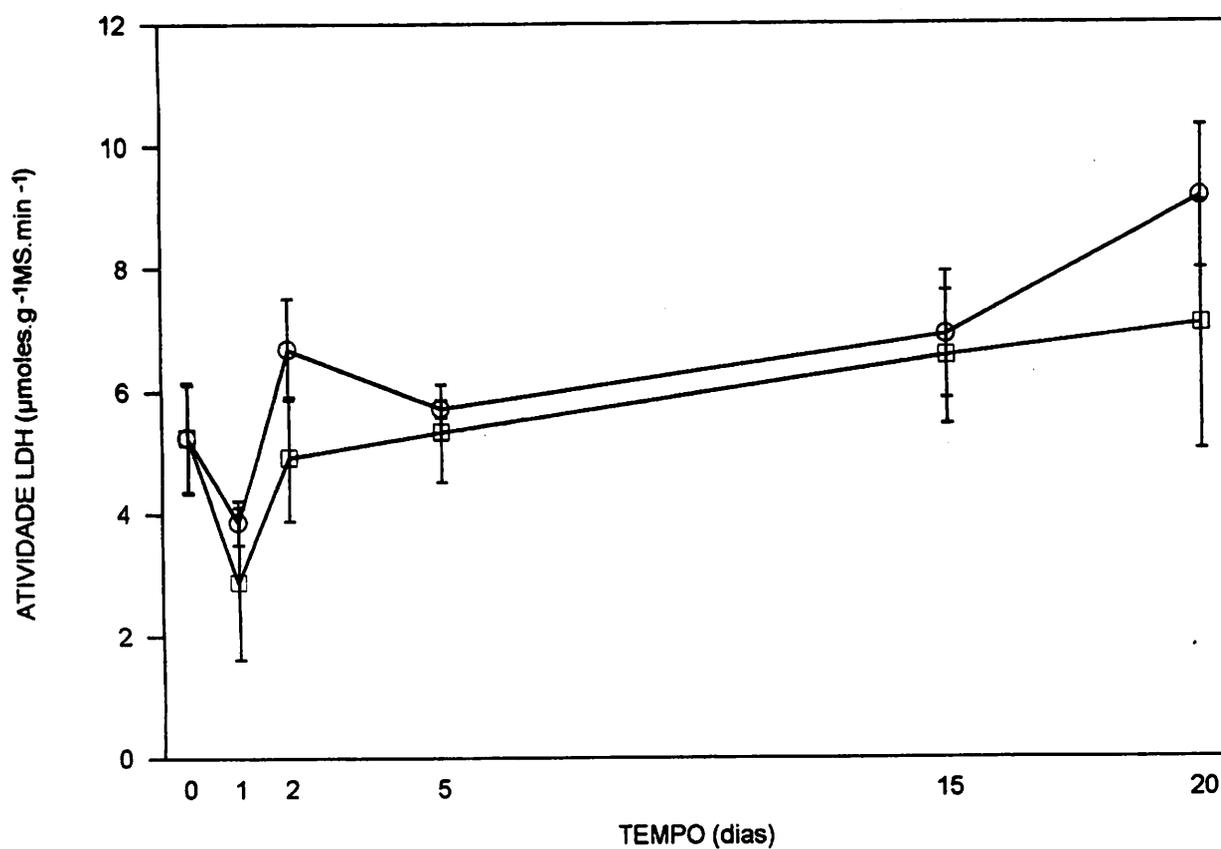


FIGURA 6. Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em sementes de açai (*E. oleracea* Mart.), submetidas a diferentes tempos de anoxia (□) e aeração (○). Média de três repetições.

importante na reciclagem do  $\text{NAD}^+$  e consequente produção de energia pela operação contínua da glicólise.

Para o açaí a importância da Lactato Desidrogenase na sobrevivência de suas sementes parece ser evidente, haja visto que sua atividade sempre foi superior a da Álcool Desidrogenase, não importando o tratamento. Crawford (1977), destaca a importância do metabolismo anaeróbico, não muito ativo, na manutenção da viabilidade das sementes sob anoxia, relacionando a perda de viabilidade com a intensificação do metabolismo anaeróbico com a consequente produção de etanol em níveis suficientemente elevados para causar danos irreversíveis aos tecidos das sementes. Jackson, Herman e Goodenough (1982) divergindo dessas observações, constataram que até mesmo concentrações de etanol dez vezes maiores que as reconhecidas como letais, não causaram nenhum tipo de dano aos tecidos de sementes de ervilha sob aeração. Isto não significa que o mesmo não cause danos, mas relaciona-o ao estado de anaerobiose e às consequências metabólicas desse estado.

Os resultados obtidos no presente trabalho, demonstram que tanto as sementes aeradas quanto as anóxicas, apresentam o metabolismo, embora não muito ativo, direcionado principalmente à via láctica (Figura 6) e num segundo plano, à via etanólica que aparentemente, foram indispensáveis à manutenção da viabilidade das sementes em anoxia.

Em relação ao lactato, Xia e Saglio (1992) sugerem que a manutenção da integridade de raízes de milho sob anoxia, não depende da taxa de síntese de

lactato, mas sim da presença de proteínas de membrana que são capazes de excretar este metabólito para o meio, impedindo a queda danosa do pH citoplasmático.

#### **4.3. Efeito da anoxia sobre o desenvolvimento e atividade das enzimas Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em plântulas de açaí**

A atividade das enzimas Álcool Desidrogenase (Figura 7) e Lactato Desidrogenase (Figura 8), nas raízes de plântulas de açaí, praticamente não variou em relação aos tratamentos aerado e anóxico, durante os dezesseis dias de tratamento.

A presença de atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em raízes no tempo zero, indica, a exemplo das sementes (Figuras 5 e 6), serem estas enzimas constitutivas.

A partir do oitavo dia de aplicação dos tratamentos, houve uma tendência de maior atividade dessas enzimas nos caulículos de plântulas submetidas à aeração, quando comparadas com aquelas sob anoxia (Figuras 7 e 8). É possível que esta tendência seja decorrente da expressão diferencial de enzimas de Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, induzida pelos tratamentos.

Em relação aos tecidos, notou-se que tanto a atividade da Álcool Desidrogenase como da Lactato Desidrogenase foram maiores no caulículo, um pouco menores nas raízes (Figuras 7 e 8) e bem inferiores nas sementes (Figuras 5 e 6). Essas diferenças quantitativas entre os órgãos, também foram encontradas em plântulas de arroz e *Echinochloa* (Coob e Kennedy, 1987) e milho (Okimoto et al., 1980). Para Okimoto et al. (1980), estas variações são produtos da expressão gênica

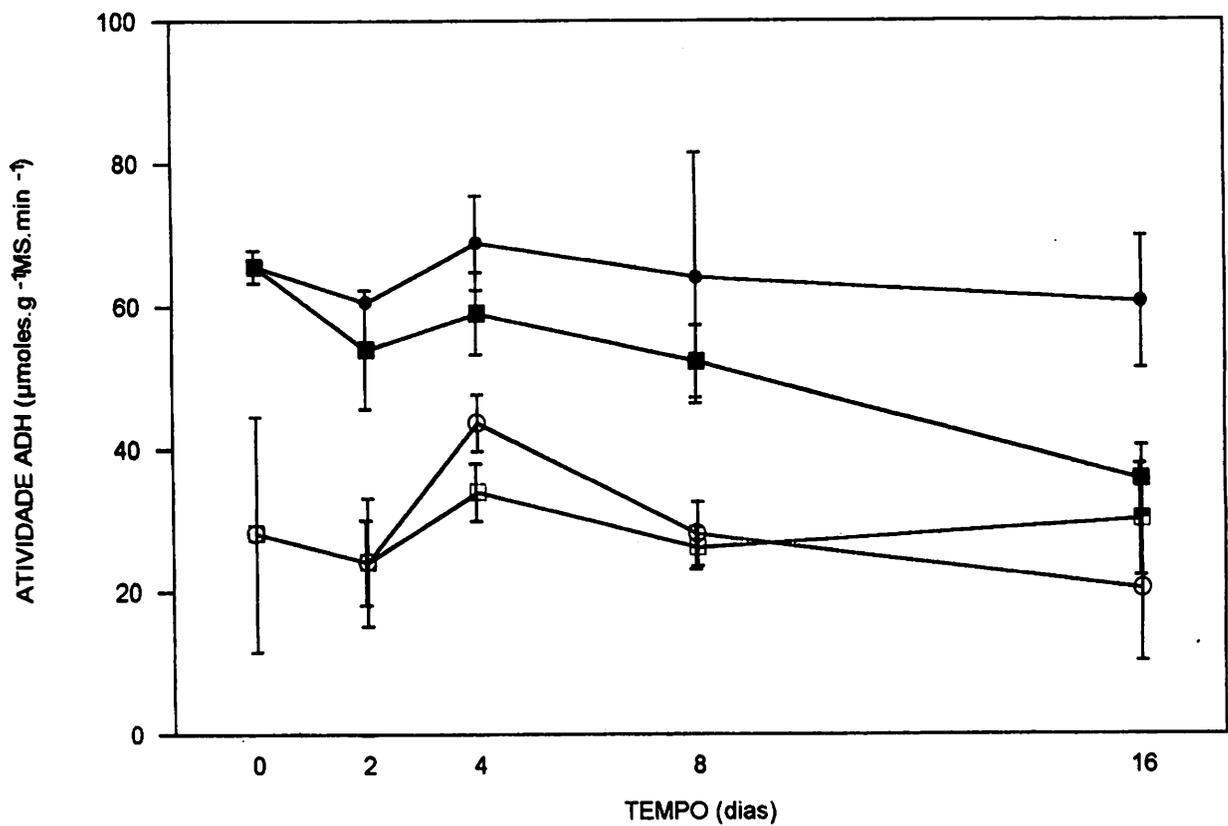


FIGURA 7. Atividade da Álcool Desidrogenase (ADH), na raiz (vazio) e caulículo (cheio) de açaí (*E. oleracea* Mart.), sob aeração (círculo) e anoxia (quadrado).

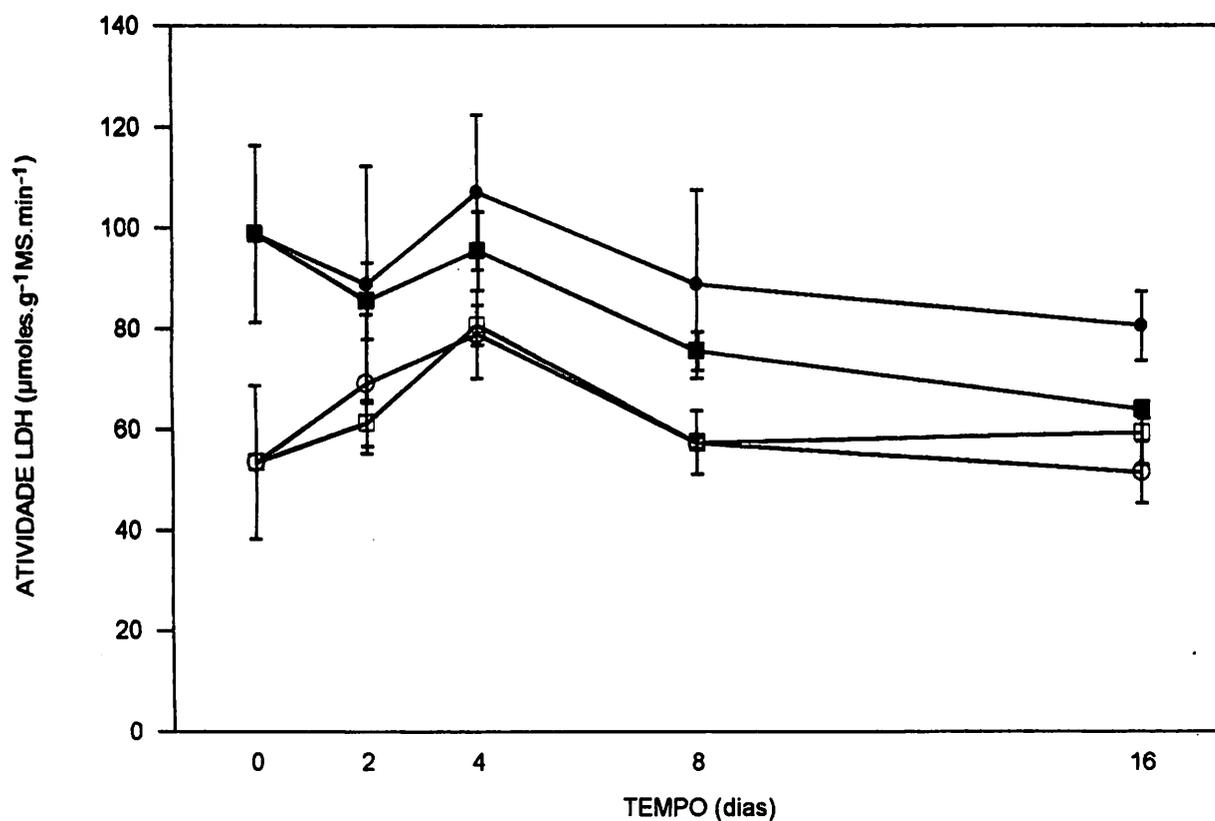


FIGURA 8. Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH), na raiz (vazio) e caulículo (cheio) de açaí (*E. oleracea* Mart.), sob aeração (círculo) e anoxia (quadrado).

em cada órgão e devem significar diferentes estratégias de tolerância ao déficit de oxigênio no meio. Mujer et al. (1993), relacionaram a tolerância ou não à anaerobiose entre diferentes espécies do gênero *Echinochloa*, à síntese de diferentes classes de proteínas, as quais possivelmente, são responsáveis pela manutenção de níveis satisfatórios de carga energética. Contudo, parece perfeitamente possível, que variações nas expressões dessas classes de proteínas, possam gerar respostas distintas à anaerobiose.

É importante destacar que a atividade da Lactato Desidrogenase em plântulas foi sempre maior que a da Álcool Desidrogenase, em todo o período experimental, independentemente do tecido analisado. Esta característica de desviar, preferencialmente, o metabolismo anaeróbico no sentido da síntese de lactato, parece ser uma constante em todos os órgãos analisados, inclusive nas sementes.

A teoria de McManmon e Crawford (1971), na qual plantas tolerantes à anoxia, desviam seu metabolismo anaeróbico do carbono para produtos finais como, malato, lactato e outros ácidos orgânicos e apresentam uma baixa atividade da Álcool Desidrogenase e conseqüente produção de etanol em níveis não tóxicos, teve sua generalização rejeitada (Smith e Ap Rees, 1979; Rumpho e Kennedy, 1981 e Jackson et al., 1982).

A idéia de uma teoria unificada de tolerância à anoxia, não tem sustentação teórica, pois parece existir mecanismos distintos de tolerância, dependendo da espécie e até mesmo do tecido. Entretanto, estudos da variação da carga energética do adenilato, imposta pela anoxia em tecidos vegetais, confirmam esta variável como única generalização possível de ser feita (Rasi-Caldogno e Michelis, 1978; Saglio et

al., 1980; Mocquot et al., 1981; Pradet e Raymond, 1983; Rumpho et al., 1984; Al-Ani et al., 1985 e Raymond et al., 1985). Neste caso, plantas que mantêm cargas energéticas satisfatórias, quando sob anoxia, preservam sua integridade celular, desde que contenham reservas disponíveis. Para o açáí, inexistem esses estudos.

Os resultados de atividade da Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase, em plântulas de açáí, retratam um metabolismo anaeróbico muito ativo, caracterizando uma estratégia de tolerância diferente daquela das sementes. Mostraram também, a constitutividade de ambas as enzimas, além de confirmar o envolvimento dessas enzimas na tolerância destas plântulas à anoxia, que não se desenvolveram nesta condição (Figura 9), mas que retomaram seu crescimento, pós-anaerobiose, em 100% das plântulas submetidas aos diferentes tempos de anoxia.

O fato de *E. oleracea* ocorrer comumente em áreas sujeitas ao alagamento periódico, induz a especular-se sobre a existência de um mecanismo de antecipação ao estresse anaeróbico, evitando os danos provocados durante a fase de ajustamento metabólico, que talvez sejam prevenidos pela presença de enzimas constitutivas de Álcool Desidrogenase e Lactato Desidrogenase em todos os tecidos da referida espécie.

Neste contexto, pode-se afirmar que a tolerância à anoxia relaciona-se, indubitavelmente, com um ajustamento metabólico entre as reações que consomem e produzem ATP, mantendo uma carga energética do adenilato suficiente para preservar a integridade celular, e que o metabolismo anaeróbico desempenha um papel importantíssimo nesse ajustamento.

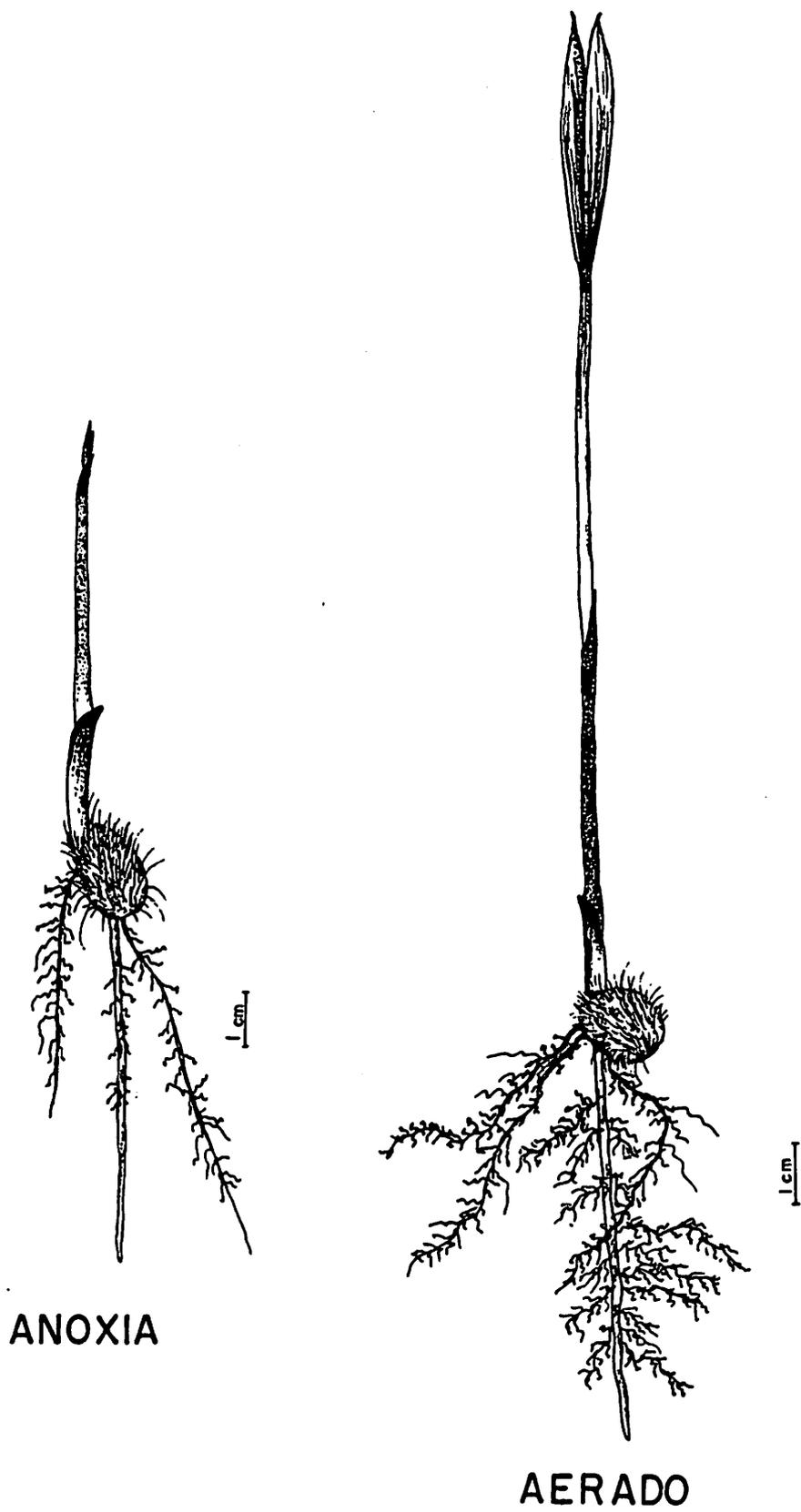


FIGURA 9. Plântulas de açai (*E. oleracea* Mart.), após 16 dias sob tratamento anóxico e aerado.

#### **4.4. Efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a formação de aerênquimas em raízes de plântulas de açaí**

Após a aplicação dos diferentes tratamentos de disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo, observou-se a formação de aerênquimas nas raízes de plântulas independentemente do tratamento aplicado (Figura 10). As raízes de plântulas de açaí demonstraram portanto, ter um comportamento semelhante as raízes de arroz, em relação a formação de aerênquimas, não necessitando do estímulo do estresse por alagamento para formá-los.

Jackson, Fenning e Jenkins (1985), demonstraram que em raízes de arroz a formação de aerênquimas foi independente da pressão parcial de oxigênio aplicada nas mesma, além de concluir que nessa espécie o etileno parece não ter muita influência na formação do aerênquima. Provavelmente, as raízes de açaí são geneticamente “programadas” para desenvolverem aerênquima em seus córtexes.

Mais uma vez fica caracterizado um processo de antecipação do açaí ao estresse por alagamento, agora representado por uma adaptação anatômica.

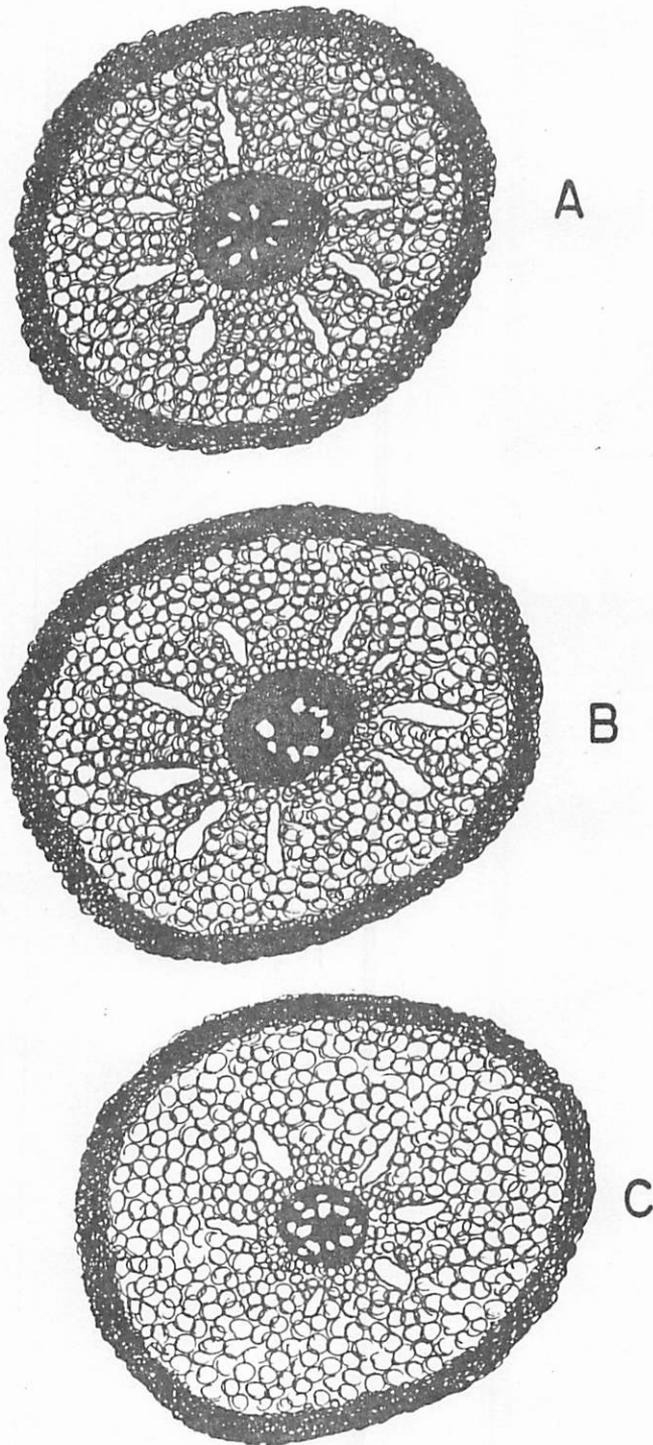


FIGURA 10. Corte transversal de ápice de raiz primária de plântulas de açai (*E. oleracea* Mart.) cultivadas em hidroponia sob A) aeração intermitente (2 horas.dia<sup>-1</sup>), B) sem aeração e C) aeração constante.

## **5. CONCLUSÕES**

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

- Sementes de açaí não germinam sob anaerobiose, porém permanecem viáveis, durante vinte dias, germinando posteriormente;
- Plântulas de açaí não crescem sob anaerobiose, porém toleram essa condição por dezesseis dias, retomando seu crescimento após a anaerobiose.
- A formação de aerênquimas em raízes de plântulas de açaí ocorre mesmo em condição normal de aeração, independentemente de indução por alagamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ANI, A.; BRUZAN, F.; RAYMOND, P.; SAINT-GES, V.; LEBLANC, J.M.; PRADET, A. Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. **Plant Physiology**, Rockville, v.79, p.885-890, 1985.
- ALDASORO, I.; NICOLÁS, G. Fermentative products and dark CO<sub>2</sub> fixation during germination of seeds of *Cicer arietinum*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.19, p.3-5, 1980.
- ALPI, A.; BEEVERS, H. Effects of O<sub>2</sub> concentration on rice seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, p.30-34, 1983.
- ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advance Botany Research**, v.7, p.225-332, 1979.

- ASPART, L.; GOT, A.; MOCQUOT, M.B.; PRADET, A. Adaptation of ribonucleic acid metabolism to anoxia in rice embryos. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, p.155-121, 1983.
- AVADHANI, P.N.; GREENWAY, H.; L'EFROY, R.; PRIOR, L. Alcoholic fermentation and malate metabolism in rice germinating at low oxygen concentrations. **Australian Journal Plant Physiology**, East Melbourne, v.5, p.15-25, 1978.
- BAILEY-SERRES, J.; FREELING, M. Hypoxic stress induced changes in ribosomes of maize seedling roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.94, p.1237-1243, 1990.
- COBB, B.G.; KENNEDY, R.A. Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oryza sativa*) and *Echinochloa* seedling. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.10, p.633-638, 1987.
- CRAWFORD, R.M.M. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. **New Phytologist**, Cambridge, v.79, p.511-517, 1977.
- DAVIES, D.D. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: \_\_\_\_\_ (ed.). **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. v.2, p.581-611.

- DREW, M.C. Effects of flooding and oxygen deficiency on plant mineral nutrition. In: LÄUCHLI, A.; TINKER, P.B. (eds.). **Advances In plant nutrition**. New York: Praeger, 1988. p.115-159.
- DREW, M.C.; JACKSON, M.B.; GIFFARD, S. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. **Planta**, New York, v.147, p.83-88, 1979.
- DREW, M.C.; LYNCH, J.M. Soil anaerobiosis, microorganisms and root function. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v18, p.37-66, 1980.
- FALESI, I.C. O estado atual dos conhecimentos sobre os solos da Amazônia Brasileira. In: INSTITUTO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO NORTE. **Zoneamento agrícola da Amazônia**; 1ª aproximação. Belém: 1972. p.68-122. (Boletim Técnico, 54).
- FERL, R.J.; BRENNAN, M.D.; SCHWARTZ, D. In vitro translation of maize ADH: evidence for the anaerobic induction of mRNA. **Biochemistry Genetic**, v.18, p.681-692, 1980.
- FOX, T.C.; BOZARTH, C.S.; KENNEDY, R.A. Modeling of energy requirements for growth of *barnyard grass* seedlings under aerobic and anaerobic conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.5-323, 1988.

- FOX, T.C.; KENNEDY, R.A. Mitochondrial enzymes in aerobically and anaerobically germinated seedlings of *Echinochloa* and rice. **Planta**, New York, v.184, p.510-514, 1991.
- GARCIA-NOVO, F.; CRAWFORD, R.M.M. Soil aeration, nitrate reduction and flooding tolerance in higher plants. **New Phytologist**, Cambridge, v.72, p.1031-1039, 1973.
- HANSON, A.D.; JACOBSEN, J.V. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and  $\alpha$ -amylase by O<sub>2</sub> deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, Rockville, v.75, p.566-572, 1984.
- HARBERD, N.P.; EDWARDS, K.J.R. The effect of a mutation causing alcohol dehydrogenase deficiency on flooding tolerance in barley. **New Phytologist**, Cambridge, v.90, p.631-644, 1982.
- HOFFMAN, N.E.; BENT, A.F.; HANSON, A.D. Induction of lactate dehydrogenase isozymes by oxygen deficit in barley root tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.658-663, 1986.
- HOLE, D.J.; COBB, B.G.; HOLE, P.S.; DREW, M.C. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low-oxygen (hypoxic) acclimation. **Plant physiology**, Rockville, v.99, p.213-218, 1992.

HOSNER, J.F. Effects of water upon the seed germination of bottom land trees. **Forest Science**, Bethesda, v.3, p.67-71, 1957.

HWANG, S.Y.; VANTOAI, T.T. Abscisic acid induces anaerobiosis tolerance in corn. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.593-597, Apr. 1991.

JACKSON, M.B. Hormones and developmental change in plants subjected to submergence or soil waterlogging. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.38, p.49-72, 1990.

JACKSON, M.B.; DREW, M.C. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: KOSLOWSKI, T.T. (ed.). **Flooding and plant growth**. Orlando: Academic Press, 1984. p.47-128.

JACKSON, M.B.; FENNING, T.M.; JENKINS, W. Aerenchyma (gas-space) formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.) is not controlled by ethylene or small partial pressures of oxygen. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.36, p.1566-1572, 1985.

JACKSON, M.B.; HERMAN, B.; GOODENOUGH, A. An examination of the importance of ethanol in causing injury to flooded plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.5, p.163-172, 1982.

JOHNSON, J.; COBB, B.G.; DREW, M.C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, p.837-841, 1989.

JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, Cambridge, v.106, p.465-495, 1987

KADOWAKI, K.I.; MATSUOKA, M.; MURAI, N.; HARADA, K. Induction of two alcohol dehydrogenase polypeptides in rice roots during anaerobiosis. **Plant Science**, Berkeley, v.54, p.29-36, 1988.

KAWASE, M. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **HortScience**, Alexandria, v.16, p.30-34, 1981.

KELLEY, P.M.; FREELING, M. Anaerobic expression of maize glucose phosphate isomerase. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.259, n.1, p.673-677, 1984a.

KELLEY, P.M.; FREELING, M. Anaerobic expression of maize fructose-1, 6-diphosphate aldolase. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v.259, n.2, p.14180-14183, 1984b.

- KENNEDY, R.A.; BARRET, S.C.H.; ZEE, D.V.; RUMPHO, M.E. Germination and seedling growth under anaerobic conditions in *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass). **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.3, p.243-248, 1980.
- KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E.; FOX, T.C. Anaerobic metabolism in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.1-6, 1992.
- KNOWLES, L.O.; KENNEDY, R.A. Lipid biochemistry of *Echinochloa crus-galli* during anaerobic germination. **Phytochemistry**, Elmsford, v.23, p.529-532, 1985.
- KOZLOWSKI, T.T. Extent, causes and impacts of flooding. In: \_\_\_\_\_. (ed.). **Flooding and Plant Growth**. Orlando: Academic Press, 1984. cap.1, p.1- 5.
- KOZLOWSKI, T.T. Water supply and tree growth. II Flooding. **Forest Abstracts**, Farnham Royal, v.43, n.2, p.145-161, Mar. 1982.
- LASZLO, A.; LAWRENCE, P.S. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Molecular and General Genetics**, New York, v.192, p.110-117, 1983.

- LEMKE-KEYES, C.A.; SACHS, M.M. Anaerobic tolerance null: a mutant allows Adh1 nulls to survive anaerobic treatment. **Journal Heredity**, Washington, v.80, p.316-319, 1989.
- McMANMON, M.; CRAWFORD, R.M.M. A Metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behaviour. **New Phytologist**, Cambridge, v.70, p.299-306, 1971.
- MOCQUOT, B.; PRAT, C.; MOUCHES, C.; PRADET, A. Effect of anoxia on energy charge and protein synthesis in rice embryo. **Plant Physiology**, Rockville, v.68, p.636-640, 1981.
- MUJER, C.V.; RUMPHO, M.C.; LIN, J.; KENNEDY, R.A. Constitutive and inducible aerobic and anaerobic stress proteins in the *Echinochloa* complex and rice. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.217-226, 1993.
- NEWMAN, K.D.; VANTOAI, T.T. Molecular characterization of the soybean alcohol dehydrogenase gene family amplified in vitro by the polymerase chain reaction. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.489-495, 1992.
- OKIMOTO, R.; SACHS, M.M.; PORTER, E.K.; FREELING, M. Patterns of polypeptide synthesis in various maize organs under anaerobiosis. **Planta**, New York, v.150, p.89-94, 1980.

PELACANI, C.R. **Estratégias de sobrevivência de espécies herbáceas em áreas inundáveis e comportamento fisiológico de espécies arbóreas e arbustivas submetidas à condições de inundação do sistema radicular.** Lavras: ESAL, 1993. 124p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal).

PONNAMPERUMA, F.N. The chemistry of submerged soils. **Advance Agronomy**, New York, v.24, p.29-95, 1972.

PRADET, A.; RAYMOND, P. Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.34, p.199-224, 1983.

RASI-CALDOGNO, F.; MICHELIS, M.I. de. Correlation between oxygen availability, energy charge, and protein synthesis in squash cotyledons isolated from germinating seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.61, p.85-88, 1978.

RAYMOND, P.; AL-ANI, A.; PRADET, A. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.79, p.879-884, 1985.

RIVOAL, J.; HANSON, A.D. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *limonium*. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.553-560, 1993.

ROBERTS, J.K.M.; CALLIS, J.; WEMMER, D.; WALBOT, V.; JARDETZKY, O. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its in survival under hypoxia. **Proceedings National Academy Science USA**, Washington, v.81, p.3379-3383, 1984.

RUMPHO, M.E.; KENNEDY, R.A. Activity of the pentose phosphate and glycolytic pathways during anaerobic germination of *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.34, n.144, p.893-902, 1983a.

RUMPHO, M.E.; KENNEDY, R.A. Anaerobic metabolism in germinating seeds of *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass): metabolite and enzyme studies. **Plant Physiology**, Rockville, v.68, p.165-168, 1981.

RUMPHO, M.E.; KENNEDY, R.A. Anaerobiosis in *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass) seedlings: intermediary metabolism and ethanol tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.72, p.44-49, 1983b.

- RUMPHO, M.E.; PRADET, A. KHALIK, A.; KENNEDY, R.A. Energy charge and emergence of the coleoptile and radicle at varying oxygen levels in *Echinochloa crus-galli*. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.62, p.133-138, 1984.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v.161, p.111-115, 1978.
- SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic proteins of maize. **Cell**, Cambridge, v.20, p.761-767, 1980.
- SACHS, M.M.; HO, T.D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.363-376, 1986.
- SAGLIO, P.H.; RAYMOND, P.; PRADET, A. Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.1053-1057, 1980.
- SCHWARTZ, D. An example of gene fixation resulting from selective advantage in suboptimal conditions. **The American Naturalist**, Chicago, v.103, p.479-481, 1969.

- SMALL, J.G.C.; POTGIETER, G.P.; BOTHA, F.C. Anoxia seed germination of *Erythrina caffra*: ethanol fermentation and response to metabolic inhibitors. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.40, p.375-381, 1989.
- SMITH, A.M.; AP REES, T. Effect of anaerobiosis on carbohydrate oxidation by roots of *Pisum sativum*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.18, p.1453-1458, 1979.
- TAIZ, L. ZEIGER, E. Stress physiology. In: \_\_\_\_\_. (ed.) **Plant Physiology**. New York: Benjamin Cummings, 1991. Cap. 14, p.365-367.
- THOMSON, C.J.; ARMSTRONG, W.; WATERS, I.; GREENWAY, H. Aerenchyma formation and associated oxygen movement in seminal and nodal roots of wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.13, p.395-403, 1990.
- VARTAPETIAN, B.B.; ANDREEVA, I.N.; KOSLOVA, G.I. The resistance to anoxia and mitochondrial fine structure of rice seedlings. **Protoplasma**, Oxford, v.88, p.215-224, 1976.
- VARTAPETIAN, B.B.; MAZLIAK, P.; LANCE, C. Lipid biosynthesis in rice coleoptiles grown in the presence or in the absence of oxygen. **Plant Science Letters**, Limerick, v.13, p.321-328, 1978.

WATERS, I.; MORRELL, S.; GREENWAY, H.; COLMER, T.D. Effects of anoxia on wheat seedlings. II. Influence of O<sub>2</sub> supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.244, p.1437-1447, 1991.

WIGNARAJAH, K.; GREENWAY, H. Effect of anaerobiosis on activities of alcohol dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in roots of *Zea mays*. **New Phytologist**, Cambridge, v.77, p.575-584, 1976.

XIA, J.; SAGLIO, P.H. Lactic acid efflux as a mechanism of hypoxic acclimation of maize root tips to anoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v.100, p.40-46, 1992.