

ATIVIDADE DE ENZIMAS FERMENTATIVAS EM PLANTAS DE *Erythrina crista-galli* L. SOB CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO

MARA CÍNTIA WINHELMANN¹; MILENE SOARES DIAS¹; CRISTINA FERREIRA LARRÉ¹; JOSÉ ANTONIO PETERS^{1,2}

¹ Laboratório de Cultura de Tecidos, UFPel, Instituto de Biologia, Depto. Botânica, Campus Universitário S/N. Capão do Leão, RS. CEP: 96160-000 – marawinhelmann@yahoo.com.br

² Professor orientador – japeters1@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Erythrina crista-galli* L., conhecida como Corticeira-do-banhado, é uma árvore de porte médio, pertence à família Fabaceae, conhecida, pela coloração vibrante de suas flores. A corticeira está listada como planta imune ao corte, pelo CONAMA, tamanha é a devastação do seu habitat natural e devido a sua importância na restauração de mata ciliar e recuperação de ecossistemas degradados em locais com inundação periódica e de rápida duração (BACKES; IRGANG, 2002).

A capacidade das espécies de se mostrarem tolerantes e adaptadas a períodos de encharcamento ou inundação do solo pode ser atribuída a mecanismos de adaptação morfo-anatômicos, fisiológicos e bioquímicos (ISHIDA et al., 2002). Dependendo da espécie, da velocidade de encharcamento do solo, da altura da lâmina d'água e do tempo de submersão, esses mecanismos podem ser mais evidentes, favorecendo a sobrevivência das plantas nestes ambientes (ISHIDA et al., 2002). Dentre as alterações morfo-anatômicas utilizadas como estratégia de tolerância ao alagamento está a formação de raízes adventícias e lenticelas hipertróficas (EZIN et al., 2010). No entanto, o excesso de água diminui a difusão de gases reduzindo a disponibilidade de oxigênio no solo e, conseqüentemente, para o sistema radicular das plantas. Essa depleção na disponibilidade de oxigênio sinaliza para um estresse abiótico fazendo, desta forma, com que a planta altere o seu metabolismo normal (DAT et al., 2004).

O alagamento modifica a atmosfera do solo, pois promove deficiência de O₂, acúmulo de CO₂, metano, etileno, gás sulfídrico (H₂S), hidrogênio e redução da respiração aeróbica (DREW, 1997). Esse ambiente provoca alterações no metabolismo das raízes, provocando uma queda imediata na respiração das mesmas, alterando o metabolismo aeróbico para anaeróbico, reduzindo a produção de ATP e, conseqüentemente, o suprimento de energia para manter o crescimento e o desenvolvimento normal da planta. Com a finalidade de tolerar o déficit de energia promovido pela hipoxia nas raízes, as plantas redirecionam as vias metabólicas para conseguir manter a produção de ATP por meio da utilização das vias fermentativas (DAT et al., 2004).

Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar o envolvimento da rota fermentativa na tolerância ao estresse ocasionado por diferenças nas condições hídricas, em plantas de *Erythrina crista-galli* L..

2. METODOLOGIA

Plantas oriundas de sementes foram cultivadas em vasos de 0,5 litros em casa de vegetação e transferidas para vasos de cinco litros. Foram utilizados dois tratamentos: plantas alagadas na raiz com a manutenção de uma lâmina de água

de até 3cm acima do solo e plantas não alagadas (controle). As avaliações foram realizadas aos 10, 20, 30, 40 e 50 dias após a indução dos tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e analisados por comparação de médias pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade da álcool desidrogenase (**ADH**, EC 1.1.1.1), lactato desidrogenase (**LDH**, EC 1.1.1.27) e piruvato descarboxilase (**PDC**, EC 4.1.1.1) foi obtido através da maceração de 500 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido contendo PVPP (5%), utilizando tampão de extração Tris-HCl (pH 7,5) (6ml) contendo DTT 1mM. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000g, a 4 °C por 20min. Do sobrenadante centrifugado foi retirada uma alíquota de 2,5mL para dessalinização por cromatografia de exclusão em coluna de sephadex G-25 M (PD-10). As proteínas solúveis foram quantificadas, no mesmo extrato, pelo método de BRADFORD (1976), utilizando soro-albumina bovina (BSA) como padrão.

A atividade da **ADH** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto dessalinizado, tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), NADH 0,2mM e acetaldeído 5mM. A oxidação do NADH foi monitorada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

A atividade da **LDH** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto, tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), NADH 0,2mM, KCN 3µM, metilpirazol 4mM e piruvato de sódio 10mM. A oxidação do NADH foi acompanhada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

A atividade da **PDC** foi avaliada a 30°C utilizando para o ensaio o extrato enzimático bruto, tampão MES-NaOH 50mM - pH 6,5, NADH 0,2mM, MgCl₂ 1mM, TPP 0,5mM, ácido oxâmico 20mM, ADH (10U) e piruvato de sódio 10mM. A reação foi monitorada a 340nm por 2 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NAD⁺ produzido por minuto de incubação por mg de proteína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação das enzimas fermentativas, foi observado que a atividade da lactato desidrogenase (LDH) nas raízes alagadas foi superior as plantas controle em todos os períodos avaliados, mostrando diferenças significativas entre os períodos de avaliação e entre os tratamentos (P<0,05). No entanto, aos 20 dias a atividade desta enzima foi incrementada em 160% em relação ao primeiro período (10 dias) e 380% em relação às plantas do tratamento controle, sendo reduzida aos 30 dias e mantendo-se até o final do experimento (50 dias) apresentando, nesse período, valores 170% superiores as plantas controle (Fig. 1A). Mesma resposta pode ser observada para a atividade da piruvato descarboxilase (PDC) embora a atividade desta enzima nas raízes alagadas tenha apresentado valores com diferenças mais acentuadas entre os tratamentos, em todos os períodos avaliados, do que as observadas para a LDH. Aos 10 dias foi observada uma atividade 880% maior que as plantas controle, diferença que também foi observada ao final do experimento (Fig. 1B).

A avaliação da atividade da álcool desidrogenase (ADH), evidenciou um aumento crescente na sua atividade ao longo dos períodos avaliados, mostrando

diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,005$) e entre os períodos de avaliação ($P < 0,005$) e interação entre os fatores. Aos 10 dias de tratamento as plantas alagadas apresentaram valores 18 vezes maiores que os observados nas plantas controle, chegando essa diferença máxima aos 40 dias onde as plantas submetidas ao alagamento apresentaram uma atividade da ADH 23 vezes maior que as plantas do tratamento controle. Ao final da pesquisa (50 dias) essa diferença foi reduzida (Fig. 1C).

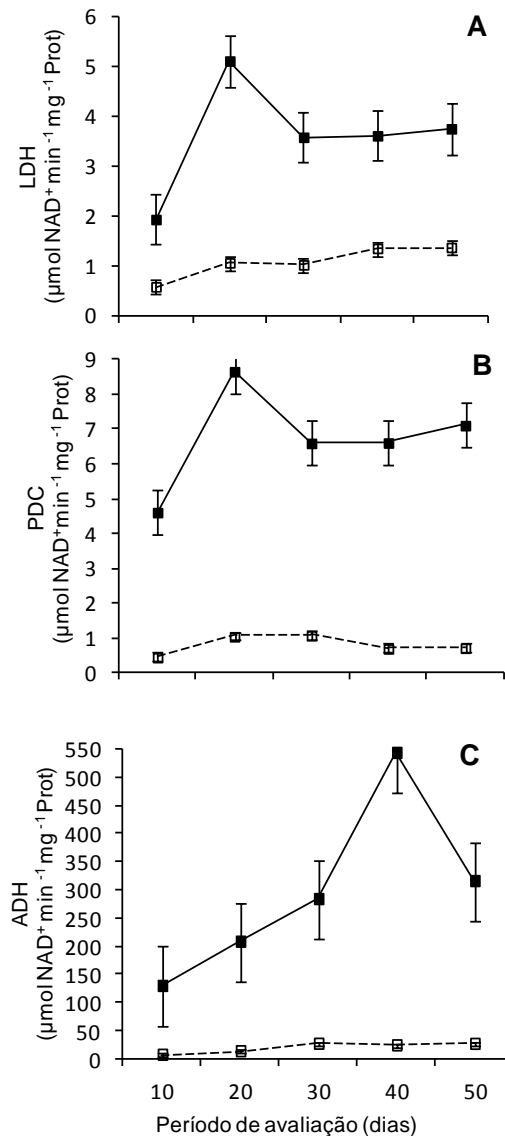


Figura 1. Atividade das enzimas LDH (A), PDC (B) e ADH (C) em raízes de plantas de corticeira do banhado submetidas ao estresse por alagamento-E (■) e em plantas controle-C (□). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A atividade da LDH teve um incremento na sua atividade aos 20 dias e, mesmo decrescendo nos períodos posteriores, ainda manteve-se superior aos valores obtidos nas plantas controle (Fig. 1A). O controle na queda do pH é promovido pelo balanço entre a produção de lactato e etanol e, conseqüentemente, pelo balanço entre a atividade das enzimas LDH e ADH. A alteração no pH, resultante da acidificação citossólica promovida pela formação do ácido láctico através da atividade da LDH, funciona como um mecanismo de sinalização em plantas sob alagamento (GRANDIS et al., 2010). O acúmulo de

lactato sob baixas concentrações de oxigênio ocorre antes da produção de etanol nas raízes. Esse declínio no pH favorece a atividade catalítica da PDC, que é responsável pela modulação da produção de lactato para etanol, sob hipoxia ou anoxia (GRANDIS et al., 2010), o que justifica os resultados obtidos na avaliação da atividade das enzimas LDH e PDC (Fig. 1A e B).

Foi observada uma elevada alteração na atividade da ADH (Fig. 1C), em relação às plantas não alagadas, em níveis crescentes com o tempo de exposição ao déficit de oxigênio, permitindo inferir que esta espécie requer, além de outros mecanismos, a utilização rápida e permanente da rota fermentativa como via alternativa para manutenção do metabolismo, regeneração de poder redutor e produção de ATP, quando submetida ao excesso de água nas raízes.

4. CONCLUSÕES

O alagamento, durante o período estudado, não compromete as plantas de *Erythrina crista-galli* L., visto que são hábeis em utilizar a rota fermentativa como alternativa para a produção de energia durante a condição hipóxica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul** : guia de identificação & interesse ecológico – as principais espécies nativas sul-brasileiras. Instituto Souza Cruz, Rio de Janeiro, 2002, 322p.

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**, v.72, p.48-254, 1976.

DAT, J.F.; CAPELLI, N.; FOLZER, H.; BOURGEADE, P.; BADOT, P.M. Sensing and signaling during plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 273-282, 2004.

DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p.223-250, 1997.

EZIN, V.; PENA, R.L.; A, A. Flooding tolerance of tomato genotypes during vegetative and reproductive stages. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 131-142, 2010.

GRANDIS, A.; GODOI, S.; BUCKERIDGE, M.S. Respostas fisiológicas de plantas amazônicas de regiões alagadas à mudanças climáticas globais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.1, p.1-12, 2010.

ISHIDA, F.; OLIVEIRA, L.E.M.; CARVALHO, C.J.R; ALVES, J.D. Efeitos da inundação parcial e total sobre o crescimento, teor de clorofila e fluorescência de *Setaria anceps* e *Paspalum repens*. **Ciência e agrotecnologia**, v.26, n.6, p.1152-1159, 2002.