

**EFEITO DO CÁLCIO EM ENZIMAS DO
SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLÂNTULAS
DO MILHO (*Zea mays* L.) ‘SARACURA’ –
BRS-4154 SUBMETIDAS À BAIXA
DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO**

DANIELA DEITOS FRIES

2006

DANIELA DEITOS FRIES

**EFEITO DO CÁLCIO EM ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE
EM PLÂNTULAS DO MILHO (*Zea mays* L.) ‘SARACURA’ – BRS-4154
SUBMETIDAS À BAIXA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO**

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

2006

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

Fries, Daniela Deitos

Efeito do cálcio em enzimas do sistema antioxidante em plântulas do milho (*Zea Mays* L.) 'Saracura' – BRS-4154 submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio / Daniela Deitos Fries. – Lavras : UFLA, 2006.

47 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Sistema antioxidante. 3. Cálcio. 4. Alagamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-584.92041

-633.15

DANIELA DEITOS FRIES

**EFEITO DO CÁLCIO EM ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE
EM PLÂNTULAS DO MILHO (*Zea mays* L.) ‘SARACURA’ – BRS-4154
SUBMETIDAS À BAIXA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO**

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 31 de maio de 2006

Profa. Dra. Ângela Maria Soares	UFLA
Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira	UFLA
Profa. Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS
Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA

Prof. Dr. José Donizeti Alves
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao CNPq, pela oportunidade de realização do curso e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. José Donizeti Alves, pela amizade, orientação, apoio e profissionalismo.

Aos membros da banca examinadora, Luiz Edson, Ângela, Patrícia, Marcelo e Alessandro (suplente), pela dedicação.

Aos funcionários e amigos, Lena, Evaristo, Tanhan, Izonel, Odorêncio, Joel, Elenir, Anderson e Lamartini, pelo auxílio e convivência.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e colaboração.

Aos professores da Fisiologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do curso, pelo companheirismo.

Ao meu marido, Reginaldo, por todo amor e incansável colaboração, me apoiando na realização de mais esta etapa.

Aos meus pais, Sérgio e Maria Enier, e meus irmãos, Fabrício e Carol, pelo carinho e apoio constante, sabendo suportar a distância e a saudade.

A todos que, de uma forma ou outra, participaram de mais esta conquista.

A Deus, que permitiu mais esta realização.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Metabolismo celular sob deficiência de oxigênio	4
2.2 Período pós-estresse	6
2.3 A cultura do milho em condições de deficiência de oxigênio	7
2.4 A tolerância do milho 'Saracura' à falta de oxigênio	8
2.5 A atuação do cálcio no aumento da tolerância à deficiência de oxigênio ..	9
2.6 Extresse oxidativo	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material vegetal	18
3.2 Montagem do experimento	18
3.3 Avaliação da sobrevivência	19
3.4 Atividade enzimática	19
3.5 Gel de atividade	21
4 RESULTADO E DISCUSSÕES	22
5 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

FRIES, Daniela Deitos. **Efeito do cálcio em enzimas do sistema antioxidante em plântulas do milho (*Zea mays* L.) ‘Saracura’ – BRS-4154 submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio.** 2006. 47 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O presente trabalho teve por objetivo verificar a influência do cálcio na atividade da ADH e de enzimas do sistema antioxidante, como SOD, CAT, APX e GR, em plântulas do milho ‘Saracura’, durante o período de baixa disponibilidade de oxigênio e o início da recuperação pós-estresse. Para a realização deste trabalho, utilizaram-se plântulas de milho da variedade Saracura (BRS-4154), Ciclo 17. A germinação foi realizada em papel de germinação embebido em água ou solução de CaCl₂ (0,75% p/v), em câmara de germinação úmida, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por quatro dias. Após esse período, o alagamento foi realizado pela submersão das plântulas em tubos de PVC com tampão sem e com CaCl₂ (0,75% p/v), borbulhando-se nitrogênio gasoso por 3 minutos. Os tubos foram selados e mantidos no escuro por períodos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Para os controles (não alagados), os rolos foram mantidos na câmara de germinação. Após cada período, as raízes foram coletadas para as análises das atividades enzimáticas e foi realizada a re-aeração, para a qual as plântulas foram retiradas dos rolos e distribuídas sobre um papel de germinação em contato direto com o ar por 30 minutos, sendo, então, coletadas as raízes. A sobrevivência ao alagamento foi realizada baseando-se no enverdecimento e no vigor das plântulas após sete dias de cultivo em caixas com vermiculita em sala de crescimento. As atividades enzimáticas foram realizadas para a ADH, SOD, CAT, APX e GR e os géis de atividade para ADH, SOD e CAT. A ADH apresentou menor atividade na presença do cálcio, sugerindo um menor gasto energético durante o período de alagamento. Foi verificado um aumento na atividade da SOD no período de re-aeração e altas atividades da CAT neste período e durante o alagamento, sugerindo que, na ausência de cálcio, podem estar sendo formadas maiores quantidades de EROs. Nessas plântulas, a eliminação desses radicais estaria sendo realizada, principalmente, por meio de catalases. Na presença do cálcio, menores atividades da ADH e CAT, juntamente com a indução da APX nos períodos de alagamento e re-aeração e da GR durante o estresse, propõem que a eliminação das EROs, neste caso, esteja sendo realizada pela rota do ascorbato/glutationa. Dessa forma, a atuação mais

¹ Orientador: José Donizeti Alves – UFLA

efetiva dessa rota poderia estar relacionada ao aumento da tolerância em plântulas do milho 'Saracura' em função da presença do cálcio.

ABSTRACT

FRIES, Daniela Deitos. **Effect of calcium on enzymes of antioxidant system in maize (*Zea mays* L.) 'Saracura' – BRS-4154 plantlets submitted to low oxygen availability.** 2006. 47 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology Program) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

The present work aimed to verify the influence of calcium in the ADH and antioxidant system enzymes, like SOD, CAT, APX and GR, in maize seedlings "Saracura" during the period of low availability of oxygen and the onset of post-stress recovery. In this research there were used maize plantlets, 'Saracura' (BRS-4154), cycle 17. The germination was made in germination paper wet in water or CaCl₂ (0,75% w/v) and kept in germination chamber at 27±2°C in dark, during four days. After this period it was made the flooding by submerging the plantlets in PVC tubes containing buffer with and without CaCl₂, bubbling the gaseous nitrogen for three minutes. The tubes were sealed and kept in dark for 3, 6, 12, 24, 48 and 72 hours. For the controls (without flooded) the rolls were kept in germination chamber. After each period, the roots were collected to enzymatic analysis and the re-aeration was made, where the plantlets were removed from the rolls and distributed in germination paper in direct contact with air during 30 minutes, and after this time the roots were collected. The flooding survival was made based in the greening and plantlet vigour after seven days cultivation in box with vermiculite in growth chamber. The enzymatic activities were made for ADH, SOD, CAT, APX and GR and the activity gels were obtained for ADH, SOD and CAT. The ADH showed lower activity in the calcium presence, suggesting a lower energetic demand during the flooding period. It was verified an increase in SOD activity in the period of re-aeration and the high activities of CAT in this period and during the flooding, suggesting that in the absence of calcium can be formed higher amount of EROs. In this plantlets, the elimination of these radicals could be made mainly by CAT. In the presence of calcium, lower activities of ADH and CAT, jointly with APX induction in the periods of flooding and re-aeration and of the GR during the stress, suggest the elimination of EROs, in this case, could be made by the ascorbate/glutathione pathway. In this way, the more effective pathway enzyme activity could be related with the increase of tolerance from maize 'Saracura' plantlets caused by calcium presence.

¹ Adviser: José Donizeti Alves – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas ao estresse ambiental. O crescimento, o desenvolvimento e a produção de plantas cultivadas em diferentes regiões são limitados por uma variedade de fatores bióticos e abióticos. A adaptação da plantas ao estresse ambiental resulta de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, envolvendo alterações morfológicas, anatômicas, celulares, bioquímicas e moleculares. Essas alterações variam com a espécie e o estágio de desenvolvimento da planta, assim como com o tipo de estresse e a duração e a intensidade do mesmo.

O excesso de água no solo provoca a deficiência de oxigênio e a anaerobiose, levando a uma diminuição muito acentuada de oxigênio e a um acúmulo de gás carbônico, etileno e outros gases tóxicos. Nessas condições, a difusão do oxigênio torna-se muito baixa, gerando uma situação de hipoxia (deficiência de O_2), que pode chegar facilmente à anoxia (ausência de O_2) devido à respiração dos órgãos submersos das plantas ou dos microrganismos ali existentes. O crescimento e a sobrevivência de muitas espécies vegetais são bastante prejudicados sob tais condições e a produtividade das culturas pode ser severamente reduzida.

Sob alagamento, predomina a respiração anaeróbica, iniciando com a produção de lactato e conseqüente redução do pH citosólico. O baixo pH promove um aumento na atividade da piruvato descarboxilase e desidrogenase alcoólica (ADH). O aumento da atividade da ADH é característico em plantas tolerantes, pelo fato do etanol ser uma molécula não carregada e atravessar a membrana sem consumo de ATP.

Com a paralisação da fosforilação oxidativa devido à falta de O₂, juntamente com a redução no pH, ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando o estresse oxidativo. Dessa forma, plantas que crescem sob excesso de água, além de ativarem mecanismos para a produção de energia, precisam desenvolver formas de escapar dos danos causados pelos radicais livres.

O período de recuperação após o alagamento tem grande importância na sobrevivência de plantas ao estresse, uma vez que ocorre também a formação de EROs. Sendo assim, a ativação do sistema antioxidante por meio da atividade de enzimas desse mecanismo, como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutatona (GR), pode ser uma forma de aumentar a tolerância das plantas à deficiência de oxigênio, diminuindo os danos causados durante esse período e aumentando a capacidade de recuperação pós-estresse.

No Brasil existem 28 milhões de hectares de áreas com potencial agrícola que estão sob regime de inundação intermitente. No entanto, para a implantação de culturas nessas áreas, são necessários estudos que objetivem verificar os mecanismos de tolerâncias das plantas. Em 1997, foi lançada a variedade de milho Saracura que tolera períodos intermitentes de alagamento do solo. Com o intuito de elucidar como essa variedade se adapta a ambientes alagados, a Embrapa Milho e Sorgo, em parceria com o Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, vem desenvolvendo trabalhos visando caracterizar os mecanismos envolvidos na tolerância desta variedade ao déficit de oxigênio. Esses trabalhos permitiram observar que o fornecimento de cálcio exógeno aumenta ainda mais a sobrevivência do milho “Saracura”, retardando a morte das plantas.

Com a finalidade de explorar alguns mecanismos relacionados ao aumento da tolerância em função do cálcio, o objetivo do presente trabalho foi

verificar a influência desse elemento na atividade da ADH e de enzimas do sistema antioxidante, como SOD, CAT, APX e GR, em plântulas do milho 'Saracura' durante o período de baixa disponibilidade de oxigênio e o início da recuperação pós-estresse.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo celular sob deficiência de oxigênio

Durante o ciclo natural de vida das plantas, é comum que elas passem por períodos de deficiência de oxigênio em suas raízes que, dependendo do tempo e da intensidade, podem levá-las morte. Excesso de chuvas ou irrigação, solos mal drenados ou compactados são as causas mais frequentes que influenciam na redução do oxigênio do solo (Alves et al., 2000). Nessas condições, a água ocupa os espaços antes preenchidos pelo ar, provocando uma série de mudanças nas características físicas, químicas e biológicas.

A difusão do oxigênio na água é 10.000 vezes mais lenta que no ar, tornando o ambiente radicular hipóxico. Além disso, o consumo do oxigênio remanescente devido à respiração dos órgãos submersos da planta e dos microrganismos torna esse ambiente anóxico (Armstrong et al., 1994). Em qualquer dessas situações, o desenvolvimento das plantas é prejudicado.

Como consequência da falta de oxigênio ocorre uma série de distúrbios no metabolismo das plantas que se manifestam por meio de alterações no crescimento e no desenvolvimento (Crane & Davies, 1988; Kozlowski, 1997). Essas alterações parecem estar relacionadas aos mecanismos de tolerância, levando a um ajustamento metabólico, anatômico e ou morfológico, que permite às plantas sobreviverem por períodos mais prolongados nessas condições (Drew, 1997).

As alterações se manifestam como adaptações celulares pela formação de aerênquimas e raízes adventícias e alongação de caules e folhas (Almeida et al., 2003; He et al., 1996; Kolb et al., 1998; Zeng et al., 1999). Dentre as alterações metabólicas ou moleculares devido à baixa disponibilidade de

oxigênio inclui-se o desvio do metabolismo aeróbico para a via anaeróbica, a qual tem baixo rendimento energético. Ao mesmo tempo, ocorre repressão da síntese de polipeptídios aeróbicos e a indução da síntese de polipeptídios anaeróbicos (Sachs et al., 1980). A maioria desses polipeptídios foi identificada como enzimas envolvidas na fermentação e metabolismo de açúcares-fosfato, cuja síntese é regulada na de transcrição e na pós-transcrição (Drew, 1997; Fennoy et al., 1998; Guglielminetti et al., 1995; Sachs et al., 1996; Subbaiah & Sachs, 2003; Zhang et al., 2005).

A fermentação de açúcares tem uma função crucial na sobrevivência de plantas à anoxia (Bouny & Saglio, 1996; Drew, 1997; Ellis et al., 1999) e a expressão de genes envolvidos nessa rota tem sido extensivamente estudada em níveis de mRNA e proteínas (Chang et al., 2000; Ellis et al., 1999; Sachs et al., 1996). A desidrogenase alcoólica (ADH), que catalisa a redução do acetaldeído tóxico a etanol, é transcricionalmente induzida em hipoxia ou anoxia (Hole et al., 1992; Preiszner et al., 2001). Em raízes de milho, foi observado um aumento de 50 vezes no mRNA dessa enzima, após 5 a 8 horas de hipoxia (Gerlach et al., 1982). Mutantes de *Arabidopsis* que não expressam a ADH são mais sensíveis ao estresse hipóxico que o tipo selvagem (Ellis et al., 1999).

O etanol é o principal produto final do metabolismo anaeróbico em plantas, uma vez que, ao contrário do lactato, não é tóxico e não acidifica o citoplasma. A acidificação do citoplasma é um dos maiores determinantes da intolerância à deficiência de oxigênio (Good & Muench, 1993; Roberts et al., 1985). A presença do lactato reduz o pH citosólico (pH 7,4 para 6,8 em raízes de milho), com conseqüente inibição da desidrogenase do lactato (LDH) e ativação da descarboxilase do piruvato (PDC), levando à produção de etanol (Hole et al., 1992; Tadege et al., 1999).

A aclimatação à falta de oxigênio não requer somente um rápido aumento nos níveis de enzimas da rota fermentativa, uma vez que a tolerância

está relacionada à habilidade de sustentar a fermentação sob períodos prolongados de anoxia (Bouny & Saglio, 1996; Chang et al., 2000). Além disso, a indução de genes no início da adaptação anaeróbica é significativamente diferenciada daquela das fases posteriores (Zhang et al, 2005).

A indução de proteínas sintetizadas durante a aclimação compreende somente uma pequena porcentagem da síntese total de proteínas e não há referência para inferir que esse pequeno componente contribui exclusivamente para a tolerância à anoxia (Chang et al., 2000). Além disso, outras atividades celulares têm sido implicadas na tolerância à baixa concentração de oxigênio, incluindo regulação do pH (Xia & Roberts, 1996), sinal de tradução (Subbaiah et al., 1994a e b) e resistência ao estresse oxidativo pós-anóxico (Crawford & Braendle, 1996).

2.2 Período pós-estresse

O período inicial da recuperação após o estresse por falta de oxigênio pode ser crucial na sobrevivência das plantas. Apesar da maioria das injúrias acontecer durante o período de estresse, danos também ocorrem no retorno das plantas às condições normais de oxigênio (VanToai & Bolles, 1991).

Segundo Ellis et al. (1999), existe uma possibilidade de que os mecanismos de tolerância induzidos por um pré-tratamento hipóxico sejam mais eficazes após o retorno às condições aeradas que durante o próprio período de estresse.

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos primeiros minutos da restauração da oxigenação do meio provocando injúrias pós-anóxicas, como a peroxidação de lipídeos em espécies intolerantes, tem sido amplamente documentado (Biemelt et al., 1998; Blokhina et al., 1999; Blokhina et al., 2003). Embora a natureza dessas injúrias nessas espécies comumente leve

à morte da planta, o fenômeno que desencadeia tal resposta ainda não é bem conhecido. A toxicidade pelo oxigênio tem sido apontada como o principal mecanismo de injúria pós-anóxica a partir da formação de O_2^- (VanToai et al., 1991), primeiro intermediário na redução do O_2 , que atua como precursor para a formação de outros radicais livres (Elstner, 1987).

2.3 A cultura do milho em condições de deficiência de oxigênio

A deficiência de oxigênio no solo, causada pelo excesso de água, é um dos fatores determinantes na redução da produtividade das mais variadas espécies de plantas. Essas condições são encontradas em, aproximadamente, 28 milhões de hectares de solos com potencial agrícola (Silva, 1984).

Algumas espécies de plantas, como, por exemplo, o arroz, conseguem sobreviver em condições de hipoxia ou anoxia, devido a adaptações anatômicas, que permitem a difusão interna do oxigênio atmosférico para as raízes submersas, assim como adaptações fisiológicas e bioquímicas. Plantas que não apresentam esses mecanismos de tolerância têm os crescimentos vegetativo e reprodutivo reduzidos, de forma que a permanência prolongada sob deficiência de oxigênio pode levá-las à morte.

O insucesso do desenvolvimento da cultura do milho em solos com períodos intermitentes de excesso de água está relacionado à alta sensibilidade dessa cultura a esses ambientes. Essas características levaram pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, a lançarem no mercado, em 1997, a variedade Saracura (BRS-4154). Após vários ciclos de seleção massal sob condições de alta umidade do solo, essa variedade revelou-se como uma das mais adequadas para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento.

2.4 A tolerância do milho ‘Saracura’ à falta de oxigênio

Um aumento na porosidade de raiz do ciclo 1 (C1) para o ciclo 4 (C4) devido ao encharcamento, foi observado por Parentoni et al. (1997) ao estudarem os quatro primeiros ciclos do milho ‘Saracura’. Essa porosidade foi relacionada à provável formação de aerênquimas, os quais são fundamentais para uma maior aeração do sistema radicular em condição de hipoxia. Essa característica foi confirmada por Dantas et al. (2001), ao verificarem a formação de aerênquimas, do tipo lisígeno, em raízes e coleóptilos de plântulas do milho ‘Saracura’. Esses autores concluíram que a hipoxia potencializou o desenvolvimento de aerênquimas, devido a uma maior atividade das enzimas de degradação: celulase, poligalacturonase e xiloglucano-endo-transglicolase. Mais recentemente, por meio de técnica de hibridização subtrativa por supressão, detectou-se, nessa variedade, o gene que expressa a paracaspase, enzima da rota de morte celular programada, associada à formação dessas estruturas (Pinto, 2004).

Verificou-se que, em ambiente semi-controlado, plântulas do milho ‘Saracura’ foram muito superiores na tolerância ao alagamento quando comparadas com plântulas de uma variedade não tolerante, BR-107. Após quatro dias sob deficiência de oxigênio, enquanto a variedade não tolerante apresentava índices de sobrevivência próximos de zero, o milho ‘Saracura’ apresentou um percentual de 73% de sobrevivência e, mesmo após cinco dias, ainda manteve o índice em torno de 29%. Somente a partir do quarto dia de hipoxia, as plântulas apresentaram queda acentuada na sobrevivência, com reflexos negativos para a sua recuperação pós-hipoxia. Essas plântulas apresentaram intensa lise celular no mesocótilo, evoluindo de uma região translúcida a uma forte constrição, levando ao tombamento e morte da mesma. Tal característica foi mais precocemente observada na variedade BR-107. A formação da região translúcida

no mesocótilo é um indicativo da irreversibilidade dos danos causados pelo déficit de oxigênio (Vitorino et al., 2001).

2.5 A atuação do cálcio no aumento da tolerância à deficiência de oxigênio

Os genes que codificam os polipeptídios anaeróbicos são rapidamente ligados, até mesmo em hipoxia branda e rapidamente desligados sob re-oxigenação. Sendo assim, um rápido e preciso sistema para sentir a falta do oxigênio se faz necessário (Subbaiah & Sachs, 2003). Rotas mediadas por cálcio foram identificadas na indução de genes sob anoxia e na sobrevivência pós-anóxica de plântulas de milho (Subbaiah et al., 1994a, 1994b e 1998), arroz e *Arabidopsis* (Chung & Ferl, 1999; Klok et al., 2002; Sedbrook et al., 1995).

A anoxia pode ser percebida, em um primeiro momento, nas mitocôndrias, uma vez que o oxigênio deixa de estar disponível como acceptor de elétrons na cadeia de transporte mitocondrial. Ao mesmo tempo, sob períodos de anoxia maiores que 30 minutos, ocorre a perda do potencial de membrana dessa organela, o que pode ser responsável pela liberação de cálcio para o citosol (Subbaiah et al., 1994b; Subbaiah & Sachs, 2003).

Mudanças na concentração de cálcio citosólico em níveis submicromolares são imediatamente reconhecidas, amplificadas e traduzidas em respostas bioquímicas e fisiológicas (Knight et al., 1996; Sanders et al., 1999; Subbaiah & Sachs, 2003). Alterações fisiológicas e na expressão gênica em função da deficiência de oxigênio foram precedidas e sinalizadas pela elevação de cálcio citosólico em milho (Subbaiah et al., 1994a, 1994b). Nesses trabalhos, o uso de bloqueadores de canais de cálcio mostrou que esse elemento agiu como um tradutor de sinais. Além disso, acredita-se que o cálcio atue também como um estabilizador da homeostase iônica, uma vez que esse componente não deixa de ser chave na rota celular de adaptação ao estresse (Subbaiah & Sachs, 2003).

Em trabalhos com o milho ‘Saracura’, verificou-se que o fornecimento exógeno de cálcio prolongou o período de tolerância à hipoxia desta variedade de dois para quatro dias, sem prejuízo na taxa de sobrevivência (Alves et al., 2002). A atuação de cálcio endógeno na sobrevivência de plântulas de milho ao estresse anaeróbico foi evidenciada por Subbaiah et al. (1994b) que concluíram que esse elemento exerce importante papel na sobrevivência de plântulas de milho em ambiente anaeróbico. A mobilização do cálcio de reservatórios intracelulares até o citoplasma induziu transcrição dos mRNAs *adh1* e *sh1* que, uma vez traduzidos, levaram à síntese da desidrogenase alcoólica e sintase da sacarose, respectivamente, tornando as plântulas mais tolerantes ao estresse gasoso (Subbaiah et al., 1994a e b).

Quando o cálcio esteve presente no período de germinação, plântulas do milho ‘Saracura’ tiveram um aumento na sobrevivência à hipoxia. Esse aumento foi ainda mais significativo quando, além do período de germinação, o cálcio foi adicionado também no alagamento (Alves et al., 2002; Fries, 2003). O alto índice de sobrevivência ao alagamento na presença do cálcio está relacionado a uma redução do crescimento da plântula. Essa redução ocorreu, principalmente, quando esse elemento foi adicionado por mais de 24 horas e os maiores índices de sobrevivência estavam relacionados aos tratamentos com maiores reduções no crescimento (Alves et al., 2002; Purcino, 2001).

Ao avaliar plântulas do milho ‘Saracura’ germinadas por dois e quatro dias na presença de cálcio, Fries (2003) verificou que a redução no crescimento em função desse elemento foi significativa somente nas plântulas mais velhas. Esse menor desenvolvimento esteve relacionado a uma menor utilização de açúcares solúveis pela plântula. Além disso, a menor atividade da invertase ácida do vacúolo, observada tanto em plântulas de dois quanto de quatro dias de germinação, resultou em um menor potencial osmótico nas células, promovendo uma redução na elongação celular (Fries, 2003).

Ao analisar o efeito do cálcio nos períodos de germinação e ou alagamento de plântulas do milho ‘Saracura’, Fries (2003) reafirmou a influência desse elemento na tolerância ao alagamento de plântulas de quatro dias, observada por Alves et al. (2002), mostrando que elas recuperaram-se mais rapidamente dos danos causados pelo estresse que aquelas que não tiveram contato com o cálcio. Por outro lado, verificaram que plântulas com dois dias de idade são tolerantes a esse tipo de estresse, independente da presença desse elemento.

2.6 Estresse oxidativo

Um dos efeitos mais pronunciados do déficit de oxigênio está relacionado ao acúmulo celular de moléculas que apresentam, pelo menos, um elétron não-compartilhado na camada de valência, os chamados radicais livres. Em face da espontaneidade das reações em organismos adaptados ao modo de vida aeróbico, o aparecimento de radicais livres intracelulares é normal durante o ciclo de vida das plantas. Esses radicais passam a ter um efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes antioxidantes. Em qualquer uma dessas situações, começa a predominar um estresse oxidativo, denominado, em muitos casos como “explosão oxidativa” (Resende et al., 2003).

A falta de oxigênio interfere diretamente na respiração, no transporte de elétrons, paralisando a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, levando a uma redução na carga energética (Albert et al., 1983; VanToai, 1989). A saturação da cadeia oxidativa com elétrons resulta no acúmulo de NADPH e NADH (Crawford, 1985). Assim, altos níveis de equivalentes redutores, baixa carga energética e componentes da cadeia de transporte de elétrons saturados oferecem condições favoráveis para a formação dos radicais livres ou EROs.

Dentre as principais EROs que causam danos celulares pela oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Apel & Hirt, 2004; McKersie & Leshem, 1994; Pastori & Foyer, 2002).

O oxigênio molecular é relativamente não reativo e não tóxico, devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. Entretanto, alterações na distribuição dos elétrons podem provocar a sua ativação e influenciar os sistemas biológicos. As EROs podem ser geradas dentro das células como resultado da excitação ou um “leve toque” no elétron externo, formando oxigênio singlete (1O_2), ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular, produzindo superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). Essas moléculas descritas a seguir, conforme Resende et al. (2003), são consideradas “ativas” porque não necessitam da entrada de energia para reagir com outras moléculas.

Os 1O_2 têm, aproximadamente, 2 μs de vida e são altamente destrutivos, reagindo com a maioria das moléculas biológicas (Foyer et al., 1994), porém, a maioria dos danos é próxima aos sítios onde são produzidos. São, predominantemente, gerados nos cloroplastos, por meio da transferência de energia de uma clorofila foto-excitada para o elétron do oxigênio molecular. O oxigênio singlete reage facilmente com ligações duplas e tem alta afinidade com “dienos” na membrana e aminoácidos específicos como histidina, metionina, triptofano e cisteína.

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido na planta por meio de vários mecanismos, inclusive pela ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular e lipoxigenases. Sua formação é resultante da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto e, normalmente, oxida várias moléculas orgânicas, como o ascorbato, ou atua como redutor de metais, como Fe^{3+} , nas reações de Haber-Weiss ou Fenton (Breusegem et al., 2001).

A maioria do H_2O_2 celular surge da dismutação do O_2^{*-} catalisada pela dismutase do superóxido (SOD). Peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar sua passagem através da bicamada lipídica da membrana celular. Essa capacidade de difundir rapidamente através da membrana celular favorece a rápida elicitação da resposta vegetal (Apostol et al., 1989).

Embora os radicais hidroxila tenham meia-vida curta ($< 1 \mu\text{s}$), são potencialmente fortes e com alta afinidade com biomoléculas no seu sítio de produção (Halliwell & Gutteridge, 1989), dificultando seu estudo.

Os radicais livres, por serem eletronicamente instáveis, são altamente reativos, apresentando a capacidade de reagir com um grande número de compostos, “roubando” um elétron a fim de se estabilizar (Eltner, 1987). Com a perda desse elétron, cria-se um novo radical livre, que irá deflagrar uma reação em cadeia, caracterizando, com isso, o estresse oxidativo, lesando seriamente vários componentes celulares, dentre eles, os lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (Smirnov, 1993). Modificações na estrutura e nas funções das membranas, resultantes da peroxidação de seus lipídeos são bem caracterizadas (Cakmak & Horst, 1991), podendo produzir danos ao funcionamento e à estrutura celular (Mittler et al., 2004). O estresse oxidativo é resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são geradas em células de plantas durante o funcionamento metabólico normal, especialmente nos cloroplastos e mitocôndrias (Foyer et al., 1994; Smirnov, 1993), ou sua formação é induzida por diferentes condições ambientais.

Em plantas, está bem caracterizado que, sob condições de déficit de oxigênio no solo, ocorre um aumento descontrolado de radicais livres nas células (Blokhina et al., 2003). De acordo com Blokhina et al. (2003), o acetaldeído, normalmente acumulado sob essa condição estressante, pode funcionar como doador de elétrons, ativando o O_2^{*-} que, ao sofrer dismutação pela ação da

dismutase do superóxido (SOD), forma H_2O_2 , cujo nível (desintoxicação) é regulado por catalases (CAT), por diversas peroxidases e pelo ciclo ascorbato-glutationa. Este, por sua vez, é caracterizado por uma série de reações redox acopladas, envolvendo as enzimas peroxidases do ascorbato (APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutatona (GR) (Jiménez et al., 1998).

O balanço entre a formação e a desintoxicação de EROs é crítico para a sobrevivência celular durante a falta de oxigênio (Yan et al., 1996). Sendo assim, a capacidade antioxidante das plantas é considerada um fator importante para a sua proteção contra diferentes estresses ambientais (Bartosz, 1997). A diferença fundamental entre plantas sensíveis e resistentes ao estresse oxidativo está na capacidade das plantas em reduzir os danos causados pelos radicais livres produzidos durante o estresse (Noctor & Foyer, 1998). Dentre as proteções celulares contra os efeitos deletérios das EROs se encontram: a prevenção, evitando a formação; a interceptação, neutralizando as EROs por meio de enzimas antioxidantes ou por antioxidantes de baixo peso molecular, como as vitaminas C e E, carotenóides, glutatona reduzida e outros; e o reparo, minimizando os danos causados (Henriques et al., 2001).

O sistema antioxidante enzimático, caracterizado pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes, é de fundamental importância para aumentar a tolerância da planta ao estresse. Nesse sistema, além dos antioxidantes e das enzimas de desintoxicação, como SOD, CAT e peroxidases, atuam as enzimas de regeneração dos antioxidantes, MDHAR, DHAR e GR (Blokina et al., 2003). A tolerância ao estresse pode ser aprimorada pelo aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante (Biemelt et al., 1998; Jiang & Huang, 2001; Mehlhorn et al., 1996; Monk et al., 1987).

A primeira enzima que faz parte do sistema antioxidante enzimático é a SOD, considerada uma enzima chave, uma vez que, além de remover o radical

superóxido (O_2^{*-}), é capaz de controlar outras EROs (Bowler et al., 1992). Esta enzima está presente em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (Bowler et al., 1992). No trabalho de Yan et al. (1996), quando os níveis de O_2^{*-} eram elevados, a atividade da SOD e de outras enzimas antioxidantes de folhas de milho, aumentou no primeiro dia de alagamento. Esse aumento da SOD pode ser explicado pelo fato de essa enzima ser induzida pelo substrato. Aumentos na atividade dessa enzima em tubérculos de espécies de *Iris* submetidos à anoxia foram observados por Monk et al. (1987), que a classificam como um polipeptídeo anaeróbico.

EROs são inevitavelmente formadas em compartimentos celulares. O radical superóxido é gerado pelo sistema de transporte de elétrons em plastídios e mitocôndrias e é dismutado pela SOD, formando H_2O_2 . Este, por sua vez, é produzido também por processos de β -oxidação em glioxissomas e por fotorrespiração em peroxissomas. Nestes casos, o H_2O_2 é, principalmente, detoxificado pela CAT, enquanto que, em outros compartimentos subcelulares, ele pode também, fazer parte da reação da APX. Sendo assim, o nível de H_2O_2 na célula é regulado enzimaticamente por um arranjo de catalases e peroxidases (peroxidase do ascorbato, APX e peroxidase do guaiacol, POD) localizadas em quase todos os compartimentos celulares (Asada, 1997; Asada, 1999; Willekens et al., 1995).

A CAT localiza-se, predominantemente, em peroxissomas, entretanto, pode ser encontrada também no citosol, em mitocôndrias ou em cloroplastos, nos quais sua atividade é baixa (Cakmak et al., 1993; Nemoto et al., 1996; Willekens et al., 1995). Essa enzima foi identificada entre os polipeptídios sintetizados em anaerobiose (Zhang et al., 2005). Por outro lado, a APX tem alta afinidade pelo H_2O_2 , sendo capaz de detoxificar baixas concentrações deste composto (Willekens et al., 1995). Essa enzima pode ser encontrada em cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e citosol (Cakmak et al., 1993). A

principal diferença entre a APX e a POD está em suas propriedades moleculares que determinam suas diferentes funções fisiológicas, uma vez que elas utilizam como substrato, além do H_2O_2 , ascorbato e compostos fenólicos, respectivamente (Asada, 1992; Mehlhorn et al., 1996; Takahama & Oniki, 1997).

Para manter os níveis de ascorbato em seu estado altamente reduzido, os produtos da oxidação precisam ser regenerados por reações subseqüentes. A APX utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 a água, gerando monodehidroascorbato. Este, por sua vez, pode ser diretamente reduzido a ascorbato pela ação da MDHAR (Asada, 1999; Polle & Rennenberg, 1993; Shigeoka et al., 2002). A reação catalítica dessa enzima tem como produtos, ascorbato e dehidroascorbato. Este, portanto, é reduzido a ascorbato e glutathiona oxidada, pela DHAR (Asada, 1999).

A glutathiona reduzida é um tripeptídeo abundante em tecidos de plantas e além de, juntamente com sua forma oxidada, manter um balanço redox nos compartimentos celulares, atua na eliminação do H_2O_2 citosólico e reage não-enzimaticamente com outras EROs, como oxigênio singlete, radical superóxido e radical hidroxila (Blokhina et al., 2003). Apesar disso, sua maior importância no sistema antioxidante, está em sua habilidade em regenerar outros antioxidantes, como o ácido ascórbico. Tal função ocorre via ciclo ascorbato-glutathiona, cuja redução é realizada pela GR (Henriques et al., 2001; Noctor e Foyer, 1998). Esta enzima está presente no cloroplasto e no citosol (Asada, 1997) e mantém uma alta razão de glutathiona reduzida (GSH)/glutathiona oxidada (GSSG) (Gamble & Burke, 1984). A glutathiona oxidada neste processo é regenerada pela GR, com gasto de NADPH que, por sua vez, é recuperado pela glicose-6-fosfato desidrogenase, mantendo-se, assim, o nível de glutathiona reduzida (Meister, 1995; Polle & Rennenberg, 1993).

Resumidamente, pode-se assumir que o O_2^{*-} e o H_2O_2 são removidos por uma série de reações enzimáticas, envolvendo SOD, APX, GR, MDHAR e DHAR, cuja rota é conhecida como via de Halliwell-Asada ou ciclo do ascorbato/glutathione (Polle & Rennenberg, 1993). Este ciclo é bem caracterizado na detoxificação do peróxido de hidrogênio em cloroplastos de folhas (Asada, 1992; Asada 1999; Gillham & Dodge, 1986), entretanto, sua atuação no citosol parece ser mais eficiente contra o H_2O_2 gerado (Asada, 1992; Cakmak et al., 1993; Dalton et al., 1986).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para a realização deste trabalho, utilizaram-se plântulas de milho da variedade Saracura (BRS-4154), Ciclo 17, desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo, a qual apresenta tolerância a períodos intermitentes de alagamento do solo. As cariopses utilizadas foram gentilmente cedidas pela Embrapa Milho e Sorgo.

3.2 Montagem do experimento

Cariopses de milho foram colocadas para germinar em papel de germinação embebido em água ou solução de cloreto de cálcio (CaCl_2), a 0,75% (p/v) em câmara de germinação úmida (modelo Mangelsdorss), a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por quatro dias. Após esse período, foi realizado o alagamento por meio da submersão das plântulas em tampão de alagamento: Tris-hidroximetilaminometano 5 mM, pH 8 com 100 mg.L^{-1} de ampicilina (Saab & Sachs, 1996) ou o mesmo tampão acrescido de CaCl_2 a 0,75% (p/v). Para isso, quatro rolos de papel de germinação, contendo 25 plântulas cada, foram colocados em tubos de PVC de 75 mm de diâmetro e 40 cm de altura, contendo 1,2 L do tampão. A fim de induzir a condição de baixa disponibilidade de O_2 no meio fez-se o borbulhamento com nitrogênio gasoso por 3 minutos (1 L.min^{-1}). Em seguida, os tubos foram selados e mantidos no escuro por períodos de 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Após esses períodos, as raízes foram coletadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C , para as análises das atividades enzimáticas

Para os controles (não alagados), os rolos foram mantidos na câmara de germinação, sendo as raízes coletadas após os quatro dias de germinação e após os períodos correspondentes aos tratamentos de submersão.

Após cada período de alagamento, foi realizada a re-aeração, para a qual as plântulas foram retiradas dos rolos e distribuídas sobre um papel de germinação em contato direto com o ar. Durante 30 minutos, elas foram mantidas na câmara de germinação, no escuro e após esse período, as raízes foram coletadas.

3.3 Avaliação da sobrevivência

Para o período de 72 horas, as plântulas foram submetidas a sete dias de sobrevivência ao alagamento. Esta foi realizada baseando-se no enverdecimento e vigor das plântulas após o cultivo em caixas com vermiculita, em sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas). A porcentagem da sobrevivência foi calculada em relação a 100% de sobrevivência verificada em plântulas que não foram alagadas. Ao final desse período, avaliou-se também a massa seca das plântulas.

3.4 Atividade enzimática

Extração

Duzentos miligramas de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados em 800 µL dos seguintes tampões de extração: ADH (HEPES 100 mM, pH 7,5, glicerol 15%, β-mercaptoetanol 10 mM); SOD, CAT, APX e GR (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 1 mM). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 15 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante para as análises enzimáticas.

Incubação

A incubação da ADH foi realizada a 30°C, em tampão de reação contendo Tris-HCl 150 mM, pH 8,0, NAD⁺ 0,3 mg.mL⁻¹, etanol 1%. A redução do NAD⁺ foi acompanhada a 340 nm, por 3 minutos. O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NADH produzido por minuto de incubação (Yamanoshita et al., 2005).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977), em um meio de reação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação:

$$\% \text{ DE INIBIÇÃO} = (A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$$

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A catalase foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 3 minutos, em um meio de reação contendo fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM, incubado a 28°C (Havir & McHale, 1987).

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi realizada segundo Nakano & Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM, H₂O₂ 0,1 mM.

Para atividade da redutase da glutatona (GR) foi utilizado o método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância a 340 nm por 3 minutos. O meio de reação incubado a 28°C foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM, NADPH 75 µM.

3.5 Gel de atividade

A atividade das enzimas foi avaliada pelo método PAGE não-desnaturante em gel de poliacrilamida a 7,5%. Os extratos foram quantificados pelo método de Bradford (1976) e 20 µg de proteína foram aplicados em cada canaleta. Após a corrida a 150V, a incubação e a revelação do gel foram realizadas conforme Alfenas (1998).

O gel para a avaliação da ADH foi incubado a 37°C no escuro, por 30 minutos, em 50 mL de tampão Tris-HCl 100mM, pH 7,5 contendo 15 mg de NAD⁺, 2 mg de PMS, 10 mg de MTT e 3 mL de etanol.

Para o gel de atividade da SOD, foram realizadas duas etapas: 1.^a) 20 minutos de incubação no escuro, a 30°C, em 50 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo 10 mg de MTT; 2.^a) 15 minutos, em 50 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo 1 mg de riboflavina e 0,4 mL de TEMED, sob iluminação.

Após a corrida, o gel de atividade da CAT foi colocado em solução de H₂O₂ 0,01% por 5 minutos sob agitação. Em seguida, foi lavado com água destilada e incubado por 15 minutos em uma solução de ferrocianeto de potássio 1% e cloreto de ferro 1%.

Após a incubação, os géis de atividade foram lavados com água destilada e fotografados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, a atividade da ADH em raízes de plântulas aumentou em função dos períodos de alagamento (Figura 1A). Esse aumento induzido pela deficiência de oxigênio foi significativo a partir da primeira avaliação, sendo gradativo até o final do experimento. Em 72 horas, a atividade dessa enzima alcançou valor 22 vezes maior que o observado no início do estresse na ausência de cálcio (Figura 1A) e 13 vezes maior na presença desse elemento (Figura 1B). A maior atividade da ADH se deve à síntese da enzima durante o alagamento, o que pode ser evidenciado no gel de atividade, principalmente a partir de 24 horas, com o surgimento, inclusive, de uma segunda isoforma (Figura 2A). Na presença do cálcio, onde a atividade foi menor, somente uma banda foi identificada em 48 e 72 horas de alagamento (Figura 2B). O aumento na atividade da ADH em função da deficiência de oxigênio permite reciclar o NAD^+ de maneira a manter a via glicolítica ativa (Blokhina et al., 2003; Tadege et al., 1999). Dessa forma, a produção de ATP durante a permanência das plântulas nessas condições está relacionada à capacidade das mesmas em manter essa rota por períodos mais prolongados.

Subbaiah e colaboradores mostraram, em raízes de milho sob anoxia, um aumento em concentrações micromolares do cálcio citosólico, advindos de mitocôndrias, correlacionando-o à indução da expressão de *Adh1* e outros genes (He et al., 1996; Subbaiah et al., 1994a, b, 1998). No presente trabalho, observou-se um aumento menos expressivo da atividade da enzima imposto pela deficiência de oxigênio, em função do fornecimento exógeno de cálcio (0,75%, p/v). Ainda que as causas dessa inibição parcial permaneçam desconhecidas, a presença do cálcio tem um efeito benéfico, uma vez que foi verificado que esse

elemento, quando presente nos períodos de germinação e alongamento, aumentou em torno de 43% a sobrevivência de plântulas após o período de estresse.

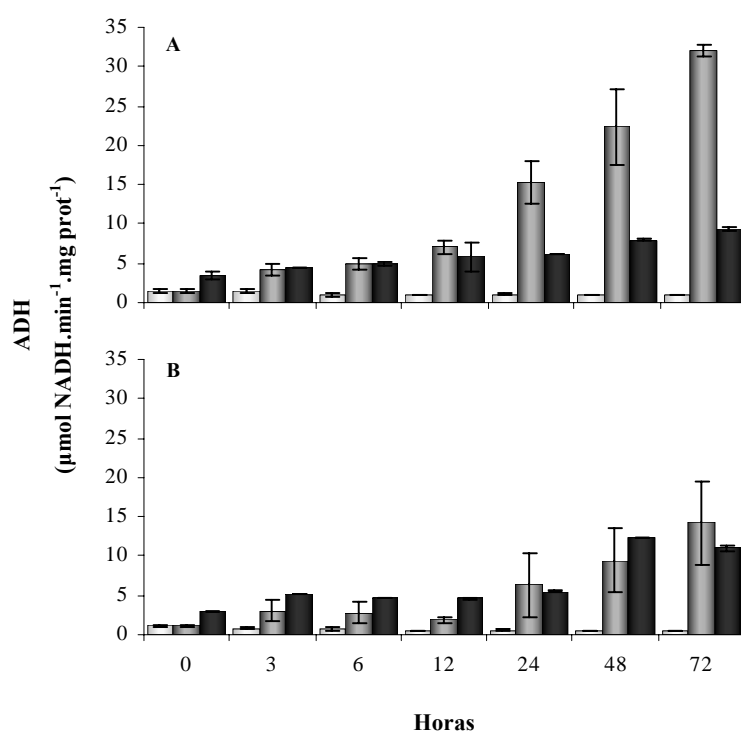


FIGURA 1. Atividade específica da desidrogenase alcoólica (ADH) em raízes de plântulas do milho ‘Saracura’ que foram germinadas por quatro dias e mantidas em condições normais de oxigênio (controle, □) ou alagadas (■) por diferentes períodos e re-aeradas por 30 minutos após o alagamento (■). Germinação e períodos subsequentes na ausência (A) ou presença de cálcio (B). As barras correspondem ao erro padrão da média.

O aumento na tolerância ao alagamento em função do cálcio pode estar relacionado a uma atividade menos intensa da via glicolítica, disponibilizando, com isso, um menor pool do substrato para a via anaeróbica, sem, contudo, comprometer a oferta energética necessária para a sobrevivência durante esse período. Como consequência desses eventos, ocorre maior disponibilidade de carboidratos para a recuperação das plântulas ao saírem do estresse. Considerando-se, em uma segunda hipótese, que a via glicolítica, na presença ou ausência desse elemento, esteja operando na mesma intensidade, a menor atividade da ADH durante o alagamento disponibilizaria, ao final do período de estresse, maiores quantidades de piruvato, prontamente disponíveis para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, gerando, com isso, maior quantidade de energia para a recuperação das plântulas.

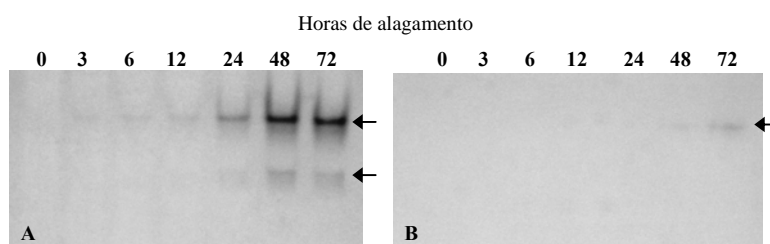


FIGURA 2. Gel de atividade da desidrogenase alcoólica (ADH) de raízes de plântulas do milho 'Saracura' que foram germinadas e alagadas na ausência (A) ou presença de cálcio (B) por diferentes períodos.

O período de 30 minutos de re-aeração promoveu decréscimos na atividade da ADH somente em plântulas que foram alagadas por 24 horas ou mais (Figura 1A). O retorno de plantas às condições normais de oxigênio promove a restauração do metabolismo aeróbico e a conseqüente redução na

atividade de enzimas fermentativas. No presente trabalho, os 30 minutos de re-aeração não foram suficientes para o completo restabelecimento da via aeróbica, uma vez que a atividade da enzima não atingiu o nível do controle.

Quando o cálcio esteve presente, a atividade da ADH não foi alterada, permanecendo com valores semelhantes aos observados ao final dos períodos de estresse (Figura 1B). O fato de não ter havido reduções na atividade dessa enzima durante a re-oxigenação pode ser devido ao curto período de recuperação e ao aumento pouco expressivo verificado, para essas plântulas, durante o alagamento.

Em experimentos envolvendo a sobrevivência de plantas a baixas concentrações de O_2 no meio, tem-se observado que aumentos na atividade da ADH, associados à saturação da cadeia de transporte de elétrons devido à falta de O_2 , estão relacionados com aumentos nas concentrações de espécies de oxigênio reativo (EROs) (Fukao & Bailey-Serres, 2004). Um grupo de enzimas é responsável pela eliminação desses radicais, dentre elas, a SOD, para a qual se verificou que, de maneira geral, houve aumentos em sua atividade durante o estresse (Figura 3). Entretanto, esses aumentos não foram induzidos pelo alagamento uma vez que, em cada avaliação, os valores não diferiram do controle, exceto nas duas últimas, em que se apresentaram menores. A atividade dessa enzima, no presente trabalho, foi relacionada a três isoformas verificadas no gel de atividade, não sendo identificadas diferenças entre os períodos de alagamento ou entre presença e ausência de cálcio (Figura 4). Sabe-se que as EROs participam dos períodos iniciais de crescimento das plantas e o radical superóxido é o primeiro a ser formado. Sua dismutação produz o H_2O_2 , reação catalisada pela SOD que é a principal responsável pela remoção do superóxido (Asada, 1999). Dessa forma, o aumento na atividade dessa enzima observado nas plântulas pode estar relacionado aos processos que envolvem a participação dos radicais livres durante o crescimento.

Sob períodos prolongados de alagamento em milho, Yan et al. (1996) verificaram reduções na atividade da SOD, causando, com isso, um aumento na concentração do superóxido nas células. No caso presente, podem-se observar, aos dois e três dias de alagamento, reduções na atividade da enzima em relação ao controle (Figura 3). Sendo assim, a menor sobrevivência das plântulas do milho 'Saracura', observada para períodos maiores de alagamento, pode estar relacionada ao acúmulo do superóxido durante o estresse, uma vez que esse radical promove a peroxidação dos lipídios da membrana, desestruturando-a durante a falta de oxigênio (Blokhina et al., 2003).

Durante a re-aeração, plântulas que não tiveram contato com o cálcio e que foram alagadas por 48 e 72 horas apresentaram aumentos na atividade da SOD em suas raízes (Figura 3A), alcançando os valores observados para o controle. Nos demais períodos e na presença do cálcio (Figura 3B), os valores de atividade observados após o período de estresse foram mantidos. Aumentos na atividade da SOD poderiam traduzir-se em proteção contra os efeitos deletérios do radical superóxido e, dessa forma, conferir maior tolerância à planta (Biemelt et al., 2000; Martinez et al., 2001). Por outro lado, como essa enzima é induzida pelo substrato, o aumento observado após a re-oxigenação pode estar relacionado à maior produção de superóxido durante o estresse ou no início da recuperação, uma vez que, segundo alguns autores, os primeiros momentos de re-aeração influenciam em aumentos nas EROs (Biemelt et al., 1998; Blokhina et al., 1999; Blokhina et al., 2003). Dessa forma, na ausência do cálcio e em períodos de tempo maiores de estresse, a 'explosão' oxidativa pode ter sido maior e, portanto, influenciado a maior produção desses radicais.

VanToai & Bolles (1991) observaram reduções de 30% e 50% na atividade da SOD em plântulas de soja que foram re-aeradas após 1 e 2 horas de anoxia, respectivamente, quando comparadas com o controle (plântulas não alagadas), refletindo em maiores danos ocasionados pelo radical superóxido.

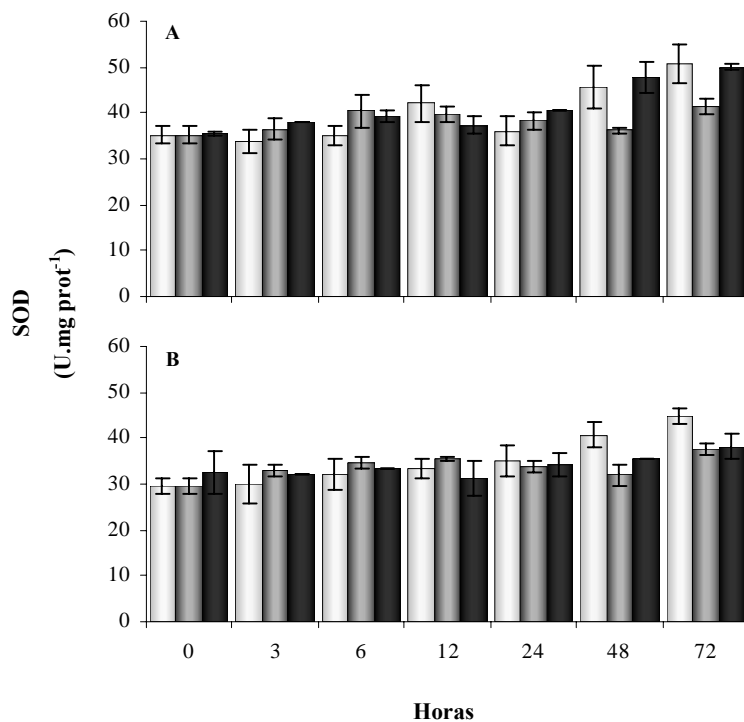


FIGURA 3. Atividade específica da dismutase do superóxido (SOD) em raízes de plântulas do milho ‘Saracura’ que foram germinadas por quatro dias e mantidas em condições normais de oxigênio (controle, □) ou alagadas (■) por diferentes períodos e re-aeradas por 30 minutos após o alagamento (■). Germinação e períodos subsequentes na ausência (A) ou presença de cálcio (B). As barras correspondem ao erro padrão da média.

Plântulas do milho ‘Saracura’ que estiveram em contato com o cálcio apresentaram maior sobrevivência e uma rápida recuperação pós-hipoxia quando comparadas com aquelas que não tiveram, contato com esse elemento. Esses resultados, juntamente com menores atividades da SOD, tanto durante o alagamento como na re-aeração, podem ser devido a uma menor produção de

casos. Na presença do cálcio, praticamente não houve diferenças entre os períodos de alagamento (Figura 6B).

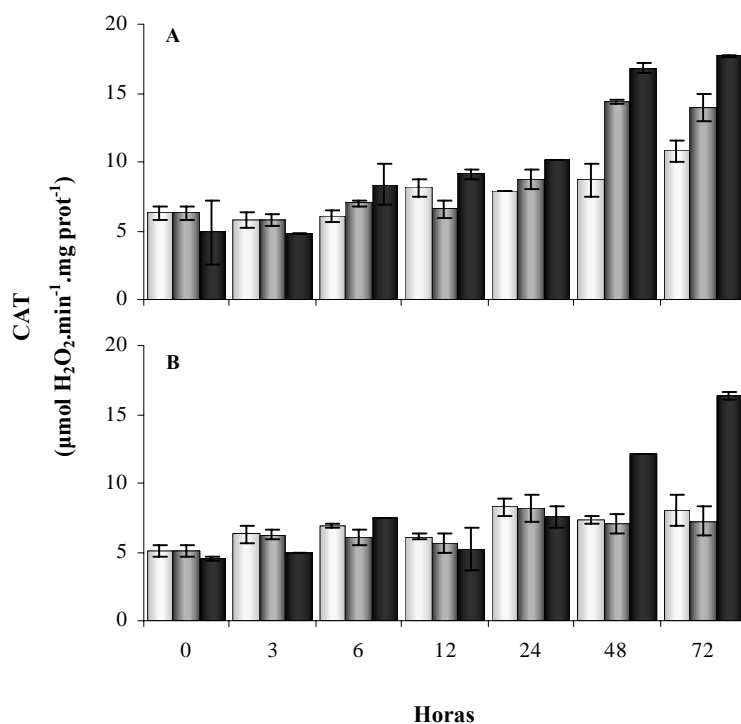


FIGURA 5. Atividade específica da catalase (CAT) em raízes de plântulas do milho ‘Saracura’ que foram germinadas por quatro dias e mantidas em condições normais de oxigênio (controle, □) ou alagadas (▒) por diferentes períodos e re-aeradas por 30 minutos após o alagamento (■). Germinação e períodos subsequentes na ausência (A) ou presença de cálcio (B). As barras correspondem ao erro padrão da média.

Monk et al. (1987) verificaram que, durante o alagamento de *Glyceria máxima*, espécie pouco tolerante, a atividade da CAT teve um aumento expressivo, mediando a oxidação do etanol à acetaldeído tóxico, conseqüentemente, aumentando as injúrias pós-anóxicas. Tomando como base as conclusões relatadas por Monk et al. (1987), pode-se sugerir que, no presente trabalho, a alta atividade da ADH (Figura 1A), culminando em maior acúmulo de etanol, juntamente com a alta atividade da CAT (Figura 5A), em 72 horas de alagamento, estariam relacionadas à menor sobrevivência e à recuperação mais lenta de plântulas do milho 'Saracura', que não estiveram em contato com o cálcio.

A re-aeração promoveu aumento na atividade da CAT em raízes de plântulas que foram alagadas por períodos 48 e 72 horas, tanto na ausência quanto na presença de cálcio (Figura 5). Apesar da alta atividade da CAT durante o período de estresse poder ser prejudicial à recuperação das plantas (Monk et al., 1987), sua atuação na eliminação do H₂O₂ durante a re-aeração, juntamente com peroxidases, é importante para minimizar os efeitos do estresse oxidativo nesse período, uma vez que a produção de radicais livres é intensificada (VanToai & Bolles, 1991).

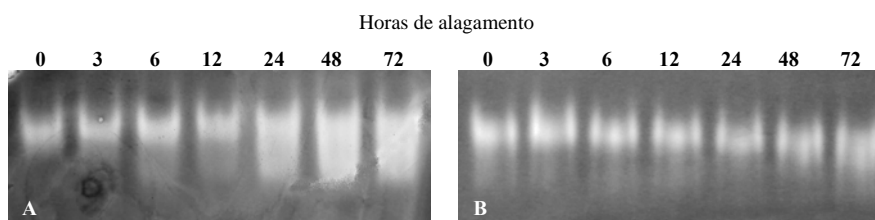


FIGURA 6. Gel de atividade da catalase (CAT) de raízes de plântulas do milho 'Saracura' que foram germinadas e alagadas na ausência (A) ou presença de cálcio (B), por diferentes períodos.

Ao contrário da CAT, o alagamento não influenciou na atividade da APX (Figura 7A). Embora tenha ocorrido um pequeno aumento em relação ao tempo de alagamento, os valores observados não diferiram do controle. Resultados semelhantes foram observados por Ushimaru et al. (1999) em plântulas de arroz, nas quais a deficiência de O_2 não alterou a atividade dessa enzima.

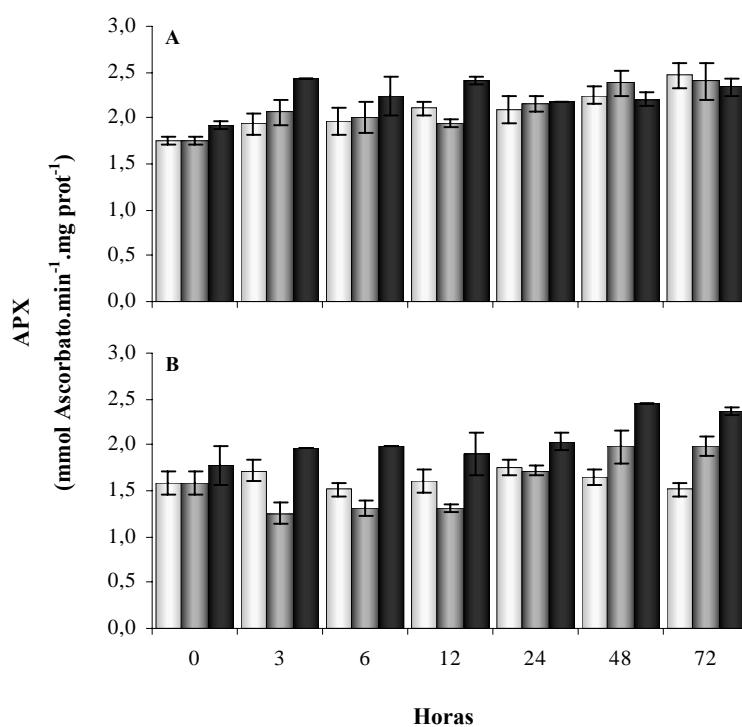


FIGURA 7. Atividade específica da peroxidase do ascorbato (APX) em raízes de plântulas do milho 'Saracura' que foram germinadas por quatro dias e mantidas em condições normais de oxigênio (controle, □) ou alagadas (▒) por diferentes períodos e re-aeradas por 30 minutos após o alagamento (■). Germinação e períodos subsequentes na ausência (A) ou presença de cálcio (B). As barras correspondem ao erro padrão da média.

Na presença do cálcio, a atividade da APX aumentou nos períodos mais prolongados de alagamento (Figura 7B). Aumentos na atividade dessa enzima em função da aplicação exógena de cálcio foram observados em plântulas de milho (Gong et al., 1997) e em duas espécies de gramíneas (Jiang & Huang, 2001) durante o estresse por calor. Segundo Gong et al. (1997), esse aumento poderia estar relacionado ao aperfeiçoamento da tolerância a esse tipo de estresse. No presente trabalho, pode ser evidenciada uma relação semelhante àquela relatada pelos autores acima citados, uma vez que a presença do cálcio, além de aumentar a tolerância de plântulas do milho 'Saracura' ao alagamento, influenciou em maiores atividades da APX, quando comparada ao controle (Figura 7B). Além disso, como essa enzima tem alta afinidade pelo H_2O_2 (Willekens et al., 1995), pode-se sugerir que, na presença desse elemento, menores quantidades desse composto estejam sendo formadas, reduzindo os danos oxidativos durante o período de estresse.

O período de re-aeração praticamente não alterou a atividade da APX em raízes de plântulas que não estiveram em contato com o cálcio (Figura 7A). Por outro lado, a sua presença influenciou em aumentos na atividade dessa enzima para todos os períodos de alagamento (Figura 7B). Uma eficiente atuação do sistema antioxidante após a re-exposição ao ar promove maior tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio. A presença do cálcio está relacionada ao aumento da sobrevivência em plântulas do milho 'Saracura' e influenciou em aumentos na atividade da APX, tanto durante o estresse como durante a re-aeração (Figura 7B). Sendo assim, pode-se sugerir que a atuação dessa enzima na eliminação do H_2O_2 esteja relacionada ao aperfeiçoamento da tolerância nessas plantas, havendo maior atuação do sistema ascorbato/glutathione. Induções na atividade dessa enzima após a re-oxigenação foram verificadas em plântulas de trigo (Biemelt et al., 1998) e de arroz (Ushimaru et al., 1997).

A APX utiliza o ascorbato como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 a água, gerando monodehidroascorbato. Este, por sua vez, precisa ser regenerado novamente a ascorbato, a fim de manter o sistema antioxidante ativo. Para isso, outras reações enzimáticas estão envolvidas, intermediadas pela glutathione, a qual é oxidada (Biemelt et al., 1998). A manutenção do pool de glutathione reduzida para o processo depende da atividade da redutase da glutathione (GR). No presente trabalho, o alagamento promoveu um aumento na atividade da GR durante o período inicial de estresse, caindo ao final do período, para valores inferiores ao controle (Figura 8A). Resultados semelhantes foram relatados por Yan et al. (1996) que verificaram uma diminuição na atividade dessa enzima sob alagamento prolongado, enquanto que curtos períodos de estresse levaram a um aumento em sua atividade.

O cálcio influenciou em maiores atividades da GR, diferindo do controle em todos os períodos de alagamento (Figura 8B). Jiang & Huang (2001) também verificaram atividades mais altas dessa enzima, em função da aplicação exógena do cálcio em gramíneas sob estresse por calor, relacionadas ao aumento da tolerância ao estresse. O aumento na atividade da GR na presença de cálcio vem confirmar uma eficiente atuação do ciclo ascorbato/glutathione durante o período de estresse. Além disso, a importância de reduzir a glutathione está no fato de que este composto, além de ser intermediário na redução do ascorbato, atua diretamente como agente antioxidante.

Durante a re-aeração após 48 e 72 horas de estresse, a atividade da GR reduziu significativamente, tanto na presença quanto na ausência de cálcio (Figura 8). Este fato poderia ser atribuído à atuação conjunta da CAT na eliminação do H_2O_2 , diminuindo a importância da participação da GR no processo. Por outro lado, o período de 30 minutos de re-aeração pode ter sido insuficiente para restaurar sua atividade. Neste aspecto, Biemelt et al. (1998) observaram que uma plena recuperação na atividade da GR durante a re-aeração,

em plântulas de trigo sob hipoxia, somente pôde ser observado após 16 horas de recuperação.

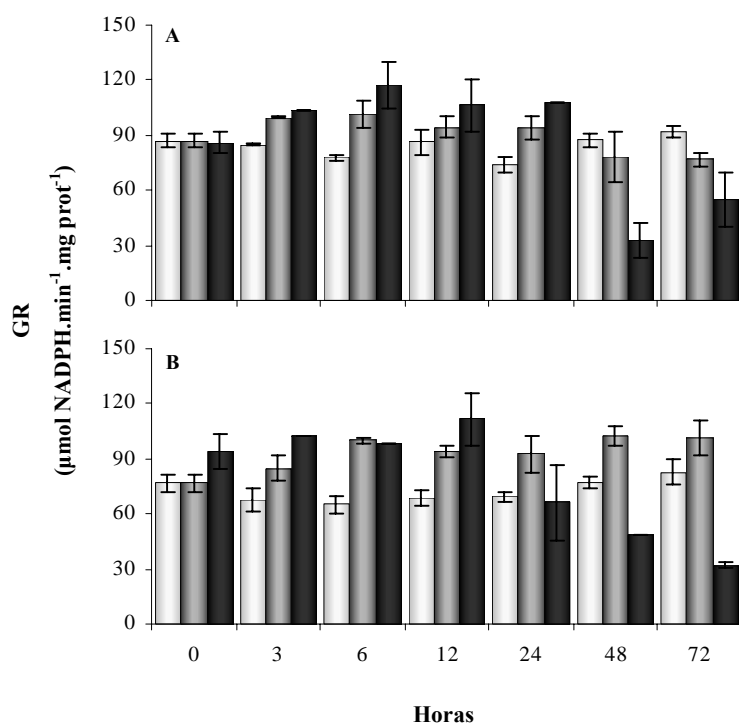


FIGURA 8. Atividade específica da redutase da glutatona (GR) em raízes de plântulas do milho 'Saracura' que foram germinadas por quatro dias e mantidas em condições normais de oxigênio (controle, □) ou alagadas (▒) por diferentes períodos e re-aeradas por 30 minutos após o alagamento (■). Germinação e períodos subsequentes na ausência (A) ou presença de cálcio (B). As barras correspondem ao erro padrão da média.

O milho 'Saracura', que tolera por si mesmo períodos intermitentes de alagamento, tem sua capacidade de recuperação pós-hipoxia aumentada quando germinado e ou alagado na presença de cálcio, caracterizada por uma rápida recuperação e um expressivo acúmulo de massa seca.

A ADH, uma das principais enzimas anaeróbicas, cuja síntese está relacionada ao aumento da tolerância ao alagamento, no milho 'Saracura' apresentou menor atividade na presença do cálcio, podendo-se sugerir que, nessas plântulas, esteja ocorrendo um menor gasto energético durante o período de alagamento, essencial para a sua recuperação. Ao mesmo tempo, como o aumento na ADH está relacionado ao maior acúmulo de EROs (Fukao & Bailey-Serres, 2004), as menores recuperação e sobrevivência das plântulas que não estiveram em contato com o cálcio podem estar relacionadas a danos mais severos ocasionados por esses radicais durante o alagamento e ou no início da recuperação.

No presente trabalho, foi observado que enzimas do sistema antioxidante apresentaram variações em suas atividades nas raízes de plântulas que foram alagadas e ou re-aeradas e estiveram ou não em contato com o cálcio. O aumento na atividade da SOD no período de re-aeração, associado às altas atividades observadas para a CAT neste período e durante o alagamento, reafirma que, na ausência de cálcio, podem estar sendo formadas maiores quantidades de EROs. Além disso, nessas plântulas, a eliminação desses radicais estaria sendo realizada, principalmente, por meio de catalases.

Na presença do cálcio, menores atividade da ADH e CAT, juntamente com a indução da APX nos períodos de alagamento e re-aeração e da GR durante o estresse, propõem que a eliminação das EROs, neste caso, esteja sendo realizada pela rota do ascorbato/glutationa. Dessa forma, a atuação mais efetiva dessa rota poderia estar relacionada ao aumento da tolerância em plântulas do milho 'Saracura' proporcionado pela presença do cálcio.

5 CONCLUSÕES

A eliminação de EROs, em plântulas do milho 'Saracura' que não estiveram em contato com o cálcio, foi realizada, preferencialmente, por meio de catalases, enquanto que, na presença desse elemento, a via preferencial foi a rota do ascorbato/glutationa.

A maior sobrevivência ao alagamento de plântulas do milho 'Saracura' que estiveram em contato com o cálcio pode estar relacionada à atuação mais efetiva da rota do ascorbato/glutationa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular Biology of the Cells**. Nova Iork: Garland Publishing, 1983. p. 67-80.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998.

ALMEIDA, A. M.; VRIEZEN, W. H.; STRAETEN, D. van der. Molecular and Physiological Mechanisms of Flooding Avoidance and Tolerance in Rice. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, n. 6, p. 743-751, Nov./Dec. 2003.

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; GOULART, P. F. P.; DANTAS, B. F.; GOUVÊA, J. A.; PURCINO, R. P.; MAGALHÃES, P. C.; FRIES, D. D.; LIVRAMENTO, D. E.; MEYER, L. E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho "Saracura" (BRS 4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, 2002.

ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M.; OLIVEIRA, L. E. M.; VITORINO, P. G. Mecanismo de tolerância de plantas ao alagamento. **Universa**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 221-242, 2000.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 109-116, May 1989.

ARMSTRONG, W.; BRANDLE, R.; JACKSON, M. B. Mechanisms of flooding tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 307-358, Dec. 1994.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, n. 2, p. 235-241, June 1992.

ASADA, K. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 715-35.

ASADA, K. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; MOCK, H. P.; GRIMM B. Expression and activity of isoenzymes of superoxide dismutase in wheat roots in response to hypoxia and anoxia. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 135-144, Feb. 2000.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 179-194, Jan. 2003. Espetial.

BLOKHINA, O. B.; FAGERSTEDT, K. V.; CHIRKOVA, T. V. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic re-aeration. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, n. 4, p. 625-632, Apr. 1999.

BOUNY, J. M.; SAGLIO, P. H. Glycolytic flux and hexokinase activities in anoxic maize root tips acclimated by hypoxic pretreatment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1, p. 87-194, May 1996.

BOWLER C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248, 1976.

BREUSEGEM, F. Van; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n. 3, p. 463-468, Nov. 1991.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide- scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 260, p. 127-132, Jan. 1993.

CHANG, W. W. P.; HUANG, L.; SHEN, M.; WEBSTER, C.; BURLINGAME, A. L.; ROBERTS, J. K. M. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 295-317, Feb. 2000.

CHUNG, H. J.; FERL, R. J. *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 429-436, Oct. 1999.

CRANE, J. H.; DAVIES, F. S. Periodic and seasonal flooding effects on survival, growth, and stomatal conductance of young rabbiteye blueberry plants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 4, p. 488-493, July 1988.

CRAWFORD, R. M. M. Effects of environmental stress on lipid metabolism in higher plants. **Agrochimica**, Pisa, v. 29, n. 1, p. 51-63, 1985.

CRAWFORD, R. M. M.; BRAENDLE, R. Oxygen deprivation stress in a changing environment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 295, p. 145-159, Feb. 1996.

DALTON, D. A.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J.; PASCOE, G. A.; EVANS, H. J. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, n. 11, p. 3811-3815, June 1986.

DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2001.

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

ELLIS, M. H.; DENNIS, E. S.; PEACOCK, W. J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 1, p. 57-64, Jan. 1999.

ELSTNER, E. F. Metabolism of activated oxygen species. In: DAVIES, D. D. **Biochemistry of plants**. Londres: Academic Press, 1987. v. 11, p. 4253-315.

FENNOY, S. L.; NONG, T.; BAILEY-SERRES, J. Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 727-735, Sept. 1998.

FOYER, C. H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 507-523, May 1994.

FRIES, D. D. **Atividade da α -amilase/invertases e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno na germinação e/ou alagamento de plântulas do milho (*Zea mays* L.) 'Saracura' - BRS-4154**. 2003. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? **TRENDS in Plant Science**, London, v. 9, n. 9, p. 449-456, Sept. 2004.

GAMBLE, P. E.; BURKE, J. J. Effect of Water Stress on the Chloroplast Antioxidant System I. Alterations in Glutathione Reductase Activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, n. 3, p. 615-621, 1984.

GERLACH, W. L.; PRYOR, A. J.; DENNIS, E. S.; FERL, R. J.; SACHS, M. M.; PEACOCK, W. J. Complementary DNA cloning and induction of the alcohol dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 1) gene (*Adh1*) of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 79, n. 9, p. 2981-2985, 1982.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GILLHAM, D. J.; DODGE, A. D. Hydrogen-peroxide-scavenging system within pea chloroplasts. A quantitative study. **Planta**, Berlin, v. 167, n. 2, p. 246-251, Feb. 1986.

GONG, M.; CHEN, S.-N.; SONG, Y.-Q.; LI, Z.-G. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collongwood, v. 24, n. 3, p. 371-379, 1997.

GOOD, A. G.; MUENCH, D. G. Long-Term Anaerobic Metabolism in Root Tissue (Metabolic Products of Pyruvate Metabolism). **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 4, p. 1163-1168, Apr. 1993.

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 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: University Press, 1989.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HE, C. J.; FINLAYSON, S. A.; DREW, M. C.; JORDAN, W. R.; MORGAN, P. W. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* subjected to mechanical impedance and hypoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 4, p. 1679-1685, Dec. 1996.

HENRIQUES, A. P.; DAFRÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnology na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

HOLE, D. J.; COOB, B. G.; HOLE, P.; DREW, M. C. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low oxygen (hypoxic) acclimation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 1, p. 213-218, May 1992.

JIANG, Y.; HUANG, B. Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 355, p. 341-349, Feb. 2001.

JIMENEZ, A.; HERNANDEZ, J. A.; PASTORI, G.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p. 1327-1335, Dec. 1998.

KLOK, E. J.; WILSON, I. W.; CHAPMAN, S. C.; EWING, R. M., SOMERVILLE, S. C.; PEACOCK, W. J.; DOLFERUS, R.; DENNIS, E. S. Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 10, p. 2481-2494, Oct. 2002.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involved two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 3, p. 489-503, Mar. 1996.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. Anatomia Ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 261-269, jul./set. 1998.

KOZLOWSKI, T. T. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, Victoria, n. 1, p. 1-29, 1997.

MARTINEZ, C. A.; LOUREIRO, M. E.; OLIVA, M. A.; MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 3, p. 505-515, Feb. 2001.

McKERSIE, B. D.; LESHEM, Y. Y. **Stress and stress coping in cultivated plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994.

MEHLHORN, H.; LELANDAIS, M.; KORTH, H. G.; FOYER, C. H. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases? **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 378, n. 3, p. 203-206, Jan. 1996.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods in Enzimology**, San Diego, v. 251, p. 3-7, 1995.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; Van BREUSEGEM, F. Abiotic stress series Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MONK, L. S.; FAGERSTEDT, K. V.; CRAWFORD, R. M. M. Superoxide dismutase as an anaerobic polypeptide. A key factor in recovery from oxygen deprivation in *Iris pseudacorus*? **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 4, p. 1016-1020, Dec. 1987.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NEMOTO, S.; OTSUKA, M.; ARAKAWA, N. A positive correlation between catalase activity and ascorbate uptake in the tissues of guinea pigs and cultured cells of mammals. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 387-395, Oct. 1996.

NOCTOR, G.; ARISI, A. C. M.; JOUANIN, L.; KUNERT, K. J.; RENNENBERG, H.; FOYER, C. H. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 321, p. 623-647, Apr. 1998.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E.; LOPES, M. A.; SANTOS, M. X.; GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. A.; SOUZA, I. R. P.; MEIRELES, W.; CORREA, L. A. Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54-Saracura. In: REUNION LATINOAMERICANA, 4.; REUNION DELA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EM MAIZ, 17., 1997, Cerete Y Cartagena de Ludias, Colômbia. **Memória...** Cerete Y Cartagena de Ludias, Colômbi: CORPOICA / CIMMYT, 1997. p. 368-373.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 2, p. 460-468, June 2002.

PINTO, A. C. **Genes induzidos por tratamento com cálcio em raízes do milho (*Zea mays* L.) 'Saracura' BRS-4154 em condições de hipoxia.** 2004. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- POLLE, A.; RENNENBERG, H. Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: MANSFIELD, T.; FOWDEN, L.; STODDARD, F. **Plant adaptation to environmental stress**. Londres: Chapman & Hall, 1993. p. 263-273.
- PREISZNER, J.; VANTOAI, T. T.; HUYNH, L.; BOLLA, R. I.; YEN, H. H. Structure and activity of a soybean Adhpromoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, New York, v. 20, n. 8, p. 763-769, Dec. 2001.
- PURCINO, R. P. **Efeito fisiológico do cálcio na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho BR- 154 “Saracura” e sua relação com o aumento da tolerância ao alagamento**. 2001. 40 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.
- ROBERTS, J. K. M.; ANDRADE, F. H.; ANDERSON, I. C. Further Evidence that Cytoplasmic Acidosis Is a Determinant of Flooding Intolerance in Plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, n. 2, p. 492-494, Feb. 1985.
- SAAB, I. N.; SACHS, M. M. A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 1, p. 385-391, Sept. 1996.
- SACHS, M. M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic protein of maize. **Cell**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 761-767, 1980.
- SACHS, M. M.; SUBBAIAH, C.; SAAB, I. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 294, p. 1-15, Jan. 1996.
- SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Communicating with Calcium. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 691-706, Apr. 1999.
- SEDBROOK, J. C.; KRONEBUSH, P. J.; BORISY, C. G.; TREWAVAS, A. J.; MASSON, P. H. Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca₂⁺ responses to anoxia in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1, p. 243-257, May 1995.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SILVA, A. R. Tolerância ao encharcamento. In: SIMPÓSIO SOBRE ALTERNATIVAS AO SISTEMA TRADICIONAL DE UTILIZAÇÃO DAS VÁRZEAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 1., 1984. 22 p.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 27-58, Sept. 1993.

SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cell. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 12, p. 1747-1762, Dec. 1994a.

SUBBAIAH, C. C.; BUSH, D. S.; SACHS, M. M. Mitochondrial contribution to the anoxic Ca_2^+ signal in maize suspension-cultured cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 3, p. 759-771, Nov. 1998.

SUBBAIAH, C. C.; SACHS, M. M. Calcium-Mediated Responses of Maize to Oxygen Deprivation. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, n. 6, p. 752-761, Nov./Dec. 2003.

SUBBAIAH, C. C.; ZHANG, J.; SACHS, M. M. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 369-376, 1994b.

TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation: new functions for an old pathway. **Trends in Plant Sciences**, London, v. 4, n. 8, p. 320-325, Aug. 1999.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. A peroxide/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 4, p. 845-852, Dec. 1997.

USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; SHIBASAKA, M.; TSUJI, H. Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 107, n. 2, p. 181-187, Oct. 1999.

USHIMARU, T.; MAKI, Y.; SANO, S.; KOSHIBA, K.; ASADA, K.; TSUJI, H. Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely ascorbate peroxidase, mono dehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, n. 7, p. 541-549, July 1997.

VANTOAI, T. T. Extraction and determination of seed adenine nucleotides by different methods for anaerobic stress evaluation. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 17, n. 3, p. 439-451, 1989.

VANTOAI, T. T.; BOLLES, C. S. Postanoxic injury in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 2, p. 588-592, Oct. 1991.

VITORINO, P. G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, P. C.; MAGALHÃES, M. M.; LIMA, L. C. O.; OLIVEIRA, L. E. M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

WILLEKENS, H.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalase in plants. **Molecular Breeding**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.

XIA, J-H.; ROBERTS, J. K. M. Regulation of H⁺ extrusion and cytoplasmic pH in maize root tips acclimated to a low-oxygen environment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1, p. 227-233, May 1996.

YAMANOSHITA, T.; MASUMORI, M.; YAGI, H.; KOJIMA, K. Effects of flooding on downstream processes of glycolysis and fermentation in roots of *Melaleuca cajuputi* seedlings. **Journal of Forest Research**, Tokyo, v. 10, n. 3, p. 199-204, June 2005.

YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S.; WANG, Z. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 179, n. 2, p. 261-268, Feb. 1996.

ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W. T.; KOCH, K. E. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.

ZHANG, Z. X.; TANG, W. H.; TAO, Y. S.; ZHENG, Y. L. cDNA Microarray Analysis of Early Response to Submerging Stress in *Zea mays* Roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 52, n. 1, p. 43-49, Jan./Feb. 2005.