



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**COMPORTAMENTO DE  $\alpha$ -AMILASE/  
INVERTASES E MUDANÇAS ANATÔMICAS  
ASSOCIADAS AO CÁLCIO EXÓGENO NO  
PERÍODO DE GERMINAÇÃO E/OU  
ALAGAMENTO DE PLÂNTULAS DO MILHO  
(*Zea mays* L.) “SARACURA” – BRS-4154**

**DANIELA DEITOS FRIES**

**2003**

**DANIELA DEITOS FRIES**

**COMPORTAMENTO DE  $\alpha$ -AMILASE/INVERTASES E MUDANÇAS ANATÔMICAS ASSOCIADAS AO CÁLCIO EXÓGENO NO PERÍODO DE GERMINAÇÃO E/OU ALAGAMENTO DE PLÂNTULAS DO MILHO (*Zea mays* L.) "SARACURA" – BRS-4154**

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

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2003

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

Fries, Daniela Deitos

Comportamento de  $\alpha$ -amilase/invertases e mudanças anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho (*Zea Mays* L.) "Saracura" – BRS-4154 / Daniela Deitos Fries. -- Lavras : UFLA, 2003.

49 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

I. Milho. 2. Cálcio. 3. Germinação. 4. Invertase. 5.  $\alpha$ -amilase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.15891

**DANIELA DEITOS FRIES**

**COMPORTAMENTO DE  $\alpha$ -AMILASE/INVERTASES E MUDANÇAS ANATÔMICAS ASSOCIADAS AO CÁLCIO EXÓGENO NO PERÍODO DE GERMINAÇÃO E/OU ALAGAMENTO DE PLÂNTULAS DO MILHO (*Zea mays* L.) “SARACURA” (BRS-4154)**

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

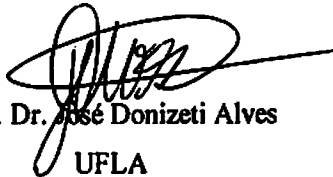
**APROVADA em 21 de fevereiro de 2003**

**Prof. Dr. Agostinho Dirceu Didonet**

**CNPAF/EMBRAPA**

**Prof. Dr. Nelson Delú Filho**

**UNICOR**



**Prof. Dr. José Donizeti Alves**

**UFLA  
(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Sérgio e Maria Enier, por terem me apoiado na realização de mais este sonho.**

**Aos meus irmãos, Fabrício e Carol, pelo carinho e compreensão.**

**Ao meu namorado, Reginaldo, pelo apoio e companheirismo.**

**Ao Prof. Dr. José Donizeti Alves, pela orientação, confiança e amizade.**

**Ao Dr. Marcelo Murad Magalhães, Prof. Dr. Nelson Delú Filho e Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela co-orientação e amizade.**

**Aos professores e orientadores no período de Embrapa, Osmar Rodrigues e Agostinho Dirceu Didonet, pelo incentivo e, principalmente, pela amizade.**

**Aos funcionários e amigos, Lena, Evaristo, Tanhan, Isonel, Odorêncio, Joel e Mauro, pelo auxílio incansável.**

**Ao Thiago, Thatiane, Igor, Tatiana, Ramon e Marilza, pela ajuda nas atividades de laboratório.**

**Aos colegas de turma, Jorge, Marina, Gustavo, Roberto, Cristina e demais colegas da Fisiologia, pela amizade e companheirismo.**

**A alguns colegas em especial, pelo auxílio prestado, às vezes, até em finais de semana.**

**Aos professores Ângela, Renato, Luiz Edson e Amauri, pela convivência amiga.**

**Aos antigos amigos, que acompanharam os primeiros passos dessa nova caminhada.**

**A Deus, por ter me dado a vida.**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1 Material vegetal .....	10
3.2 Germinação e indução da hipoxia .....	10
3.3 Sobrevivência .....	11
3.4 Análises bioquímicas .....	11
3.5 Análises anatômicas .....	13
4 RESULTADO E DISCUSSÕES .....	15
4.1 Influência do cálcio na germinação e no particionamento de reservas em plântulas de milho “Saracura” .....	15
4.2 Efeito do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho “Saracura” submetidas ao estresse hipóxico .....	20
4.3 Influência do cálcio no crescimento e no metabolismo de carboidratos nas plântulas do milho “Saracura” durante o período de estresse hipóxico e na recuperação pós-hipoxia .....	23
4.4 A influência do cálcio na morfologia e anatomia das plântulas de milho “Saracura” .....	36
5 CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## RESUMO

**FRIES, Daniela Deitos. Comportamento de  $\alpha$ -Amilase/Invertases e Mudanças Anatômicas Associadas ao Cálcio Exógeno no Período de Germinação e/ou Alagamento de Plântulas do Milho (*Zea mays* L.) “Saracura” – BRS-4154. 2003. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>**

O presente trabalho teve por objetivo verificar o comportamento de  $\alpha$ -amilase e invertases e mudanças morfológicas e anatômicas associadas ao cálcio exógeno no período de germinação e/ou alagamento de plântulas do milho “Saracura” (BRS-4154) com diferentes idades. Cariopses do “Saracura” foram germinadas e alagadas na presença e/ou ausência do cálcio. Parte do material coletado foi levado para recuperação pós-hipoxia em vermiculita visando avaliação de vigor, sobrevivência e matéria seca. Outro lote foi destinado às análises de açúcares solúveis totais e redutores,  $\alpha$ -amilase e invertases. O crescimento das plântulas reduziu drasticamente quando o cálcio esteve presente na germinação. Essa redução foi, provavelmente, devido ao acúmulo de açúcares redutores na plântula. Apesar das reservas de amido do endosperma terem sido mais facilmente degradadas na presença do cálcio, os teores de açúcares redutores foram maiores quando a atividade das invertases na plântula não apresentou diferença na presença desse elemento. Entretanto, quando a atividade dessas enzimas reduziu, o acúmulo de açúcares redutores foi semelhante àquele na ausência do cálcio. Sugere-se assim que, na presença deste elemento, estaria havendo maior exportação e menor utilização de carboidratos. O cálcio aumentou a tolerância a hipoxia em plântulas de quatro dias. Nessas plântulas observou-se um aumento gradativo na sobrevivência, devido ao contato com esse elemento. Ao compará-las com plântulas de dois dias de germinação, que se mostraram tolerantes, independente do cálcio, verificou-se que, na ausência total desse elemento, a sobrevivência reduziu significativamente com o aumento da idade. Essa diferença na sobrevivência diminuiu acentuadamente quando o cálcio esteve presente somente no tampão de alagamento ou no papel de germinação e desapareceu quando esteve em ambas as situações. O efeito estrutural do cálcio foi confirmado pela diminuição ou desaparecimento dos sintomas de lise celular ocasionados pela hipoxia. Além disso, a atuação desse elemento na tolerância ao alagamento foi marcado pelo maior acúmulo de

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: José Donizeti Alves – UFLA (Orientador), Marcelo Murad Magalhães – UFLA, Evaristo Mauro de Castro – UFLA, Nelson Delú Filho – UNICOR.

matéria seca pós-hipoxia em plântulas de quatro dias que estiveram em contato com o cálcio, principalmente na germinação. No período de alagamento, a degradação das reservas de cariopses germinadas por quatro dias foi maior que a daquelas germinadas por dois dias, independente da presença do cálcio. Por outro lado, plântulas de dois dias utilizaram com maior intensidade as reservas de amido do endosperma, sugerindo que a tolerância dessas plântulas poderia estar relacionada à translocação e utilização dessas reservas, enquanto que plântulas de quatro dias estariam utilizando outras fontes para sua manutenção. O alagamento reduziu a atividade da  $\alpha$ -amilase, indicando a atuação de outras enzimas amilolíticas em plântulas de dois dias. Nesse mesmo período, a atividade total das invertases sofreu redução brusca, independente da idade ou da presença do cálcio, sendo a invertase ácida do vacúolo a mais afetada. A presença do cálcio promoveu a morte parcial da raiz primária e o conseqüente aumento do número de raízes adventícias, bem como retardou o espessamento das células de epiderme, exoderme, endoderme e sistema vascular de parte aérea e raiz, e reduziu gradativamente a formação de aerênquimas.



## ABSTRACT

**FRIES, Daniela Deitos. Behavior of  $\alpha$ -Amylase/Invertases and Anatomical Changes Associated with Exogenous Calcium During Germination and/or Flooding of Maize Seedlings (*Zea mays* L.) "Saracura" – BRS-4154. 2003. 49p. Dissertation (Master Program in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.**

The present work aimed to verify the  $\alpha$ -amilase and invertases activities and morphologic and anatomical changes associated to the exogenous calcium during germination and/or flooding of maize seedlings "Saracura" (BRS-4154) with different ages. Cariopses of maize seedlings "Saracura" were germinated and flooded in the presence and/or absence of the calcium. Part of the collected material it was taken for survival recovery experiments in vermiculite. Another lot was destined to the analyses of total soluble and reducing sugars, and  $\alpha$ -amylase and invertases activities. The seedlings growth reduced drastically when the calcium was present in the germination. That reduction was, probably, due to the accumulation of reducing sugars in the seedling. In spite of the starch reserve in the endosperm have been more easily degraded in the presence of the calcium, the levels of reducing sugars were higher when the activity of the invertases in the seedling didn't show difference in the presence of this element. However, when the activity of those enzymes reduced, the accumulation of reducing sugars was similar to that in the absence of the calcium, suggesting like that, in the presence of this element, it would be having larger export and smaller carbohydrates use. The calcium increased the tolerance of hipoxia in seedlings with four days in this condition. In these seedlings a gradative increase was observed in the survival due to the contact with this element. When comparing them with seedlings of two days of germination, that were shown tolerant, independent of the calcium, when this cation was fully absent, the survival reduced significantly with the increase of the age. That difference in the survival decreased strongly when the calcium was only present in the flooding buffer or in the germination paper and it disappeared when it was in both situations. The structural effect of the calcium was confirmed by the decrease or disappearance of the symptoms of cellular lise caused by the hipoxia. In addition to this fact, the performance of this element in the tolerance to the flooding was marked by the highest dry matter accumulation pos-hipoxia in seedlings of four days that were in contact with the calcium, mainly in the germination. In the flooding

---

<sup>1</sup> Guidance Committee: José Donizeti Alves – UFLA (Major Professor), Marcelo Murad Magalhães – UFLA, Evaristo Mauro de Castro – UFLA, Nelson Delú Filho – UNICOR.

period, the degradation of the cariopses reserves germinated by four days it was higher than of those germinated by two days, independent of the calcium presence. On the other hand, seedlings of two days used with higher intensity the reserves of endosperm starch, suggesting that the tolerance of those seedlings could be related the translocation and use of those reserves, while, seedlings of four days, would be using other sources for your maintenance. The flooding reduced the activity of  $\alpha$ -amilase, indicating the performance of other amylolytic enzymes in seedlings of two days. In the same period, the total activity of the invertases suffered abrupt reduction, independent of the age or of the presence of the calcium, being the vacuole invertase acid the most affected. The presence of the calcium promoted the partial death of the primary root and the consequent increase in the number of adventitious roots, as well as, it delayed the thickening of epiderm, exoderm, endoderm cells and vascular system from root and shoot, and it reduced gradually the aerenchym formation.

## **1 INTRODUÇÃO**

O excesso de água no solo promove deficiência de oxigênio, tornando o ambiente radicular hipóxico. Como consequência da respiração dos órgãos submersos da planta e/ou de microrganismos, o oxigênio é esgotado e esse ambiente torna-se anóxico. Em qualquer dessas situações, o desenvolvimento das plantas é prejudicado.

As plantas respondem diferentemente a esse tipo de estresse. Aquelas que são tolerantes ou que apresentam certo grau de tolerância desenvolvem estruturas ou mecanismos que lhe permitem sobreviver por períodos mais prolongados nessas condições. Entretanto, plantas sensíveis não suportam a deficiência de oxigênio, morrendo após curtos períodos de alagamento.

Na falta de oxigênio, o metabolismo é desviado para a via anaeróbica que, além de ter baixo rendimento energético, produz substâncias tóxicas. Ao mesmo tempo, a expressão de genes responsáveis pela síntese de enzimas do metabolismo de carboidratos, assim como a formação de aerênquimas para a difusão do oxigênio para as raízes, parece estar relacionada aos mecanismos de tolerância em plantas.

Entre as plantas de interesse econômico no Brasil, o milho faz parte das culturas que estão sujeitas a ambientes encharcados, tendo a produtividade afetada devido à sua baixa tolerância a essas condições. Em função dessa sensibilidade à deficiência de oxigênio, a Embrapa Milho e Sorgo lançou no mercado, em 1997, uma variedade de milho denominada "Saracura" (BRS-4154) que, após nove ciclos de seleção massal sob condições de umidade do solo, revelou-se tolerante a períodos intermitentes de alagamento. A partir de então, a Embrapa Milho e Sorgo, em parceria com o setor de Fisiologia Vegetal

da Universidade Federal de Lavras, vem desenvolvendo trabalhos para identificar os mecanismos relacionados com a tolerância dessa variedade.

Nesses trabalhos, a variedade “Saracura” mostrou-se altamente tolerante à hipoxia, quando comparada a uma variedade suscetível. Além disso, o fornecimento exógeno de cálcio aumentou a sobrevivência dessa variedade ao alagamento, retardando a morte das plantas. Ao mesmo tempo, a presença deste elemento na germinação reduziu o crescimento das plântulas, principalmente quando era adicionado por mais de 24 horas. A redução no crescimento indicou uma possível manutenção de reservas no endosperma para posterior utilização no período de estresse.

A fim de investigar a influência do cálcio na redução do crescimento e aumento da tolerância ao alagamento, o presente trabalho teve por objetivo verificar o comportamento de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, como  $\alpha$ -amilase e invertases, assim como mudanças morfológicas e anatômicas associadas à presença do cálcio no período de germinação e/ou alagamento de plântulas de milho com diferentes idades.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O excesso de água no solo causa deficiência de oxigênio, tornando o ambiente radicular hipóxico (baixa pressão de oxigênio) ou anóxico (sem oxigênio). Dessa forma, ocorre um ajustamento metabólico, anatômico e/ou morfológico, permitindo a sobrevivência das plantas por um período mais prolongado nessas condições (Alves et al., 2000). Existem plantas que sobrevivem em ambientes alagados, outras que toleram curtos períodos nessas condições e outras que não resistem (Bray et al., 2000).

Características que permitam a tolerância das plantas a solos encharcados são mencionadas por diversos autores. A formação de aerênquimas (He et al., 1994) e raízes adventícias superficiais (Kolb et al., 1998; Zeng et al., 1999), hipertrofia de lenticelas (Kolb et al., 1998), síntese e ativação de enzimas, como desidrogenase alcoólica e sintase da sacarose (Andrews et al., 1994; Guglielminetti et al., 1995; Ricard et al., 1998), são alterações encontradas em espécies que apresentam certa tolerância a hipoxia ou anoxia.

Visando a tolerância a períodos intermitentes de encharcamento do solo, a Embrapa Milho e Sorgo lançou o milho "Saracura" (BRS-4154) que, nessas condições, obteve aumento em alguns parâmetros relacionados com a produção, os quais permitiram a sua seleção (Parentonni et al., 1997). Souza et al. (2000), ao estudarem os estágios de desenvolvimento desse milho, verificaram que a partir do estágio V6 (com seis folhas completamente expandidas) essa variedade apresentava-se mais tolerante.

Desde 1997, o setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo, vem desenvolvendo trabalhos para caracterizar os mecanismos de tolerância ao estresse dessa variedade.

A variedade de milho “Saracura” mostrou-se superior na tolerância ao alagamento quando comparada com outra não tolerante (BR-107) (Vitorino et al., 2001). Assim, quando a última apresentava índices de sobrevivência próximos a zero, a variedade “Saracura” ainda permanecia com 73%. Entretanto, a partir do quarto dia de hipoxia, os mesmos autores observaram intensa lise celular no mesocótilo. Com o prolongamento do estresse, essa região tornava-se translúcida e flácida, resultando em uma forte constrição responsável pelo tombamento e morte da plântula. Tais características foram mais precocemente observadas na BR-107. Ao observarem um amolecimento da região do mesocótilo em plantas de milho, Saab & Sachs (1996) sugeriram que a hipoxia provoca desarranjos dos componentes da parede celular.

Paralelamente, foi constatada por Dantas et al. (2001), a formação de aerênquimas, do tipo lisígeno, em raízes e coleóptilos do milho “Saracura”. Essas estruturas, que permitem a difusão do oxigênio da parte aérea para as raízes (Drew, 1997), tiveram aumento progressivo, resultante da alta atividade das enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular, em resposta a períodos crescentes de hipoxia.

Com o objetivo de prolongar o período máximo de exposição de uma cultura à deficiência de oxigênio, vários métodos têm sido utilizados, como pré-tratamentos hipóxicos antes do período de anoxia (Johnson et al., 1994), aplicações exógenas de hormônios (Ellis et al., 1999), açúcares (Perata et al., 1997) e cálcio (Subbaiah et al., 1994a; Vitorino et al., 2001). Os últimos autores verificaram que o fornecimento exógeno de cálcio prolongou a sobrevivência das duas variedades, tanto do milho “Saracura” quanto do BR-107. Neste caso, o período de tolerância da variedade “Saracura” aumentou de dois para quatro dias, sem prejuízo na taxa de sobrevivência. Concomitantemente, a formação de aerênquimas reduziu em torno de 40% quando uma solução contendo cálcio foi aplicada no papel de germinação e no tampão de alagamento (Dantas et al.,

2001). Entretanto, ao verificar um aumento na atividade das enzimas xyloglucana *endo*transglicosilase, celulase e poligalacturonase na presença do cálcio, estes mesmos autores concluíram que o cálcio aumenta a tolerância de plântulas de milho ao alagamento, atuando na integridade da parede celular, dificultando o acesso das enzimas de degradação. O cálcio associado ao ácido poligalacturônico forma os pectatos de cálcio, que atuam como agentes cimentantes entre as células, conferindo maior firmeza aos tecidos vegetais (Conway et al., 1995).

A atuação do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho ao estresse anaeróbico foi evidenciada por Subbaiah et al. (1994b), que também verificaram que a mobilização desse elemento de reservatórios intracelulares até o citoplasma induziu a síntese da desidrogenase alcoólica e sintase da sacarose. Além disso, a aplicação de cálcio exógeno aumentou a vida de prateleira de frutos, devido à maior estabilidade da parede celular (Lima, 1997; Souza, 1998).

O aumento na sobrevivência de plântulas do milho "Saracura" na presença do cálcio, verificado por Vitorino et al. (2001), foi mais eficiente quando esse elemento esteve também no alagamento. O alto índice de sobrevivência na presença do cálcio, segundo Gouvêa (2001), se deve à inibição do crescimento e à diminuição do número de plântulas com sintomas de degradação de parede celular, exercidos pela alta pressão osmótica da solução adicionada no papel de germinação e no tampão de alagamento. Dessa forma, esse autor, além de reafirmar o papel do cálcio como elemento estrutural, mostrou a existência de uma osmorregulação causada pelo componente osmótico da solução de cloreto de cálcio. Esses resultados foram confirmados por Purcino (2001), ao estudar o efeito do cálcio na germinação e crescimento inicial do milho "Saracura". Ao verificar em que ponto esse elemento estaria atuando, este autor constatou sua eficiência quando o cálcio esteve presente durante as 96 horas ou 24 e 48 horas finais de germinação. Entretanto, a

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal


Para a realização do presente trabalho, utilizaram-se plântulas de milho da variedade "Saracura" (BRS-4154), Ciclo 14 (C14), desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo, visando à tolerância de períodos intermitentes de encharcamento do solo. As cariopses utilizadas foram gentilmente cedidas pela Embrapa Milho e Sorgo.

#### 3.2 Germinação e indução da hipoxia

Cariopses de milho foram envolvidas em papel de germinação embebido em água ou solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 0,75% (p/v), totalizando 25 cariopses por rolo. Os rolos permaneceram em câmara de germinação úmida (modelo Mangelsdorss), a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  no escuro. O tempo de germinação foi contado a partir do início da embebição. Sendo assim, a dissecação das plântulas em parte aérea, raiz e endosperma para análise da massa seca, foi realizada nas plântulas a partir de dois dias, sendo repetida a cada 24 horas por um período de sete dias.

Um lote de plântulas, após dois e quatro dias de germinação em papel embebido em água ou em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v) era destinado à dissecação, congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a  $-20^\circ\text{C}$ , para posteriores análises bioquímicas. Ao mesmo tempo, outro lote dessas mesmas plântulas era submetido ao alagamento. Este foi realizado em tubos de PVC de 75 mm de diâmetro (quatro rolos por tubo) com 1,2 L do tampão de alagamento (Tris-hidroximetilaminometano 5 mM, pH 8 com  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de ampicilina) sugerido por Saab & Sachs (1996) ou o mesmo tampão acrescido de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v). Para tornar o ambiente do tubo hipóxico (3% [v/v]  $\text{O}_2$  em  $\text{N}_2$ ), fez-





se borbulhamento com nitrogênio gasoso por 3 minutos ( $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Os tubos foram mantidos no escuro e, após três dias de estresse, um lote foi destinado à análise de sobrevivência e outro à dissecação para análises de massa seca e bioquímicas.

### 3.3 Sobrevivência

A sobrevivência das plântulas foi testada nos tratamentos alagados. Para este fim, observou-se a presença ou não do sintoma de lise celular na região do mesocótilo logo após o alagamento e o enverdecimento das plântulas após cinco dias de cultivo em caixas com vermiculita em sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas). Utilizaram-se três repetições de 50 plântulas para cada tratamento, fazendo-se a contagem das plântulas sobreviventes e a dissecação para a avaliação de massa seca de parte aérea, raiz e cariopse.

### 3.4 Análises bioquímicas

#### *Carboidratos*

Os carboidratos solúveis foram extraídos pela homogeneização de 1g de massa fresca (parte aérea, raiz e endosperma) em 4 mL do seguinte tampão: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, PMSF 1 mM, DTT 1 mM, ácido ascórbico 20 mM e NaCl 200 mM, seguido de centrifugação a 20.000 g por 20 minutos a 4°C e coleta do sobrenadante. O processo era realizado mais duas vezes e os sobrenadantes combinados.

Para extração do amido, o pellet foi ressuspensionado com 8 mL do tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8 e colocado em banho-maria (100°C) por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL do preparado da enzima amiloglucosidase, contendo 12,6 unidades, incubando em banho-maria a 40°C por 2 horas. Após centrifugação a 20.000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e o volume completado para 25 mL.

A partir de alíquotas do sobrenadante foram quantificados açúcares redutores pelo método do DNS (Miller, 1959), açúcares solúveis totais e amido pelo método da Antrona (Dische, 1962).

#### *$\alpha$ -amilase*

A extração da  $\alpha$ -amilase foi realizada conforme Skadsen (1993) com algumas modificações. Um grama de massa fresca de endosperma foi homogeneizado com 4 mL de tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5), 1 mM de PMSF, 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM de DTT e 20 mM de ácido ascórbico, seguido de centrifugação a 20.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido ao banho-maria a 70°C por 20 minutos, para a inativação da  $\beta$ -amilase e outras enzimas amilolíticas. Após nova centrifugação, 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados em tampão acetato de sódio 200 mM (pH 5,5), 2% de amido solúvel e 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  em um volume final de 1 mL. A incubação ocorreu em banho-maria a 30°C por 40 minutos. As reações foram paralisadas pela submersão em  $\text{N}_2$  líquido. Reações a 0 minuto de incubação foram determinadas para eliminar açúcares redutores pré-existentes. Para a quantificação utilizou-se o método do DNS para açúcares redutores (Miller, 1959). A atividade das enzimas era obtida após 40 minutos de incubação e abatimento dos valores do tempo zero.

#### *Invertases*

A extração e incubação das invertases solúveis foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999) e da invertase ácida da parede celular segundo Cazetta et al. (1999), com algumas modificações.

A invertase neutra do citosol e invertase ácida do vacúolo foram extraídas pela homogeneização de 1 g de massa fresca em 4 mL do tampão de extração contendo 100 mM de HEPES (pH 7,5), 1 mM de PMSF, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de DTT e 20 mM de ácido ascórbico, seguida pela centrifugação a 20.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para as análises das

invertases solúveis e o pellet ressuspendido e homogeneizado durante 7 minutos com 4 mL de tampão citrato 200 mM (pH 4,8), 1 mM de PMSF, 5 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de DTT, 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de NaCl para a extração da invertase ácida da parede celular, seguido de centrifugação a 20.000 g por 20 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante para a análise da enzima.

A atividade das enzimas foi realizada em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) para a invertase neutra do citosol e em tampão citrato de sódio 200 mM (pH 4,8) para a invertase ácida do vacúolo e invertase ácida da parede celular, acrescidos de 5 mM de  $MgCl_2$  e 200 mM de sacarose, em um volume final de 1 mL. A incubação foi realizada em banho-maria a 30°C por 40 minutos. A paralisação e quantificação foram feitas da mesma forma que da  $\alpha$ -amilase. Entretanto, para a quantificação no DNS, o pH das amostras foi alterado. Devido a uma precipitação ocasionada, principalmente, pelo tampão de incubação ácido, ao adicionar-se o DNS aplicou-se uma solução de NaOH 1 M nas amostras antes da quantificação. Para as amostras da invertase neutra do citosol, em que o pH do tampão de incubação utilizado foi 7,5, utilizou-se uma alíquota do NaOH 1 M de 150  $\mu$ L, enquanto que para as invertases ácidas a alíquota foi de 300  $\mu$ L, ambas alterando o pH para próximo de 12. O NaOH não interferiu nas leituras.

### **3.5 Análises anatômicas**

Os estudos anatômicos foram efetuados nas plântulas com quatro dias de germinação na presença ou ausência de cálcio e em seus respectivos tratamentos alagados, sendo, para isso, fixados e armazenados em álcool 70%. As secções para a análise microscópica foram feitas em micrótomo, de regiões do mesocótilo em torno de 0,5 cm acima do colo e da parte superior da raiz principal por volta de 0,5 cm abaixo do colo. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio, sendo em seguida lavados por duas vezes em água

destilada e corados com Safra-Blau (safranina:azul de astra, 3:7) (Bukatsh, 1972). Após mais duas lavagens, a lâmina foi preparada com água glicerinada (1:1, v/v) e vedada com bálsamo do Canadá.

As fotomicrografias foram feitas com o auxílio de um fotomicroscópio Olympus BX-60.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Influência do cálcio na germinação e no particionamento de reservas em plântulas de milho “Saracura”

A adição de cálcio no papel de germinação reduziu drasticamente o ganho de massa seca das plântulas (Figura 1). Diferenças no crescimento da parte aérea foram pronunciadas a partir do terceiro dia de germinação (Figura 1A), enquanto que, diferenças significativas no crescimento das raízes passaram a ocorrer do segundo dia em diante (Figura 1B). Em ambos os casos, observou-se que, a partir do quinto dia, o crescimento foi semelhante, mantendo a diferença adquirida anteriormente.

Ao estudar a influência da embebição do papel de germinação com diferentes soluções salinas, Gouvêa (2001) verificou, para o milho “Saracura”, uma redução no comprimento das raízes, após o período de quatro dias de germinação, quando esta ocorreu na presença de  $\text{CaCl}_2$  (0,0689 M) e de manitol (0,1015 M). Esses resultados foram confirmados por Purcino (2001), que observou uma redução no comprimento de raiz e coleótilo além da redução na massa seca das plântulas de milho, quando estas foram germinadas em meio contendo  $\text{CaCl}_2$  (0,75%, p/v). A redução no crescimento das plântulas foi atribuída à existência de uma osmorregulação ocasionada pelo componente osmótico da solução de  $\text{CaCl}_2$  (Gouvêa, 2001) e à preservação das reservas na cariopse quando germinadas na presença do cálcio (Purcino, 2001).

Esta última autora, ao não verificar diferenças significativas entre os índices mitóticos de plântulas germinadas ou não na presença do cálcio, atribuiu a redução no crescimento à extensibilidade celular. Segundo Deuber (1992), ambos os processos, reduções na divisão ou na alongação celular, podem ser

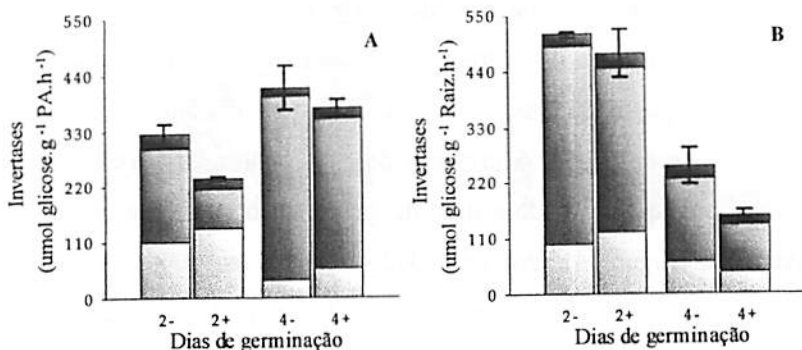


FIGURA 4. Atividade total das invertases em parte aérea (A) e raiz (B) de plântulas de milho “Saracura” após dois e quatro dias de germinação em papel embebido em água (2-; 4-) ou solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v) (2+; 4+). Invertase neutra do citosol (□), invertase ácida do vacúolo (▒) e invertase ácida da parede celular (■). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

#### 4.2 Efeito do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho “Saracura” submetidas ao estresse hipóxico

Na ausência total de cálcio a sobrevivência à hipoxia diminuiu significativamente com o aumento da idade, caindo de 93% em plântulas de dois dias para 53% em plântulas de quatro dias de germinação (Figura 5A). Quando o cálcio esteve presente somente no tampão de alagamento (Figura 5B) ou no papel de germinação (Figura 5C), esta diferença na sobrevivência diminuiu acentuadamente, desaparecendo quando esse elemento esteve em ambas as situações (Figura 5D). Ao comparar plântulas de quatro dias de germinação, observou-se que houve um aumento gradativo na sobrevivência devido ao contato com o cálcio, sendo significativo quando sua presença ocorreu simultaneamente na germinação e no alagamento (Figura 5).

Estes resultados reafirmam a influência do cálcio na tolerância à hipoxia de plântulas de quatro dias, observada por Vitorino et al. (2001) e mostram pela primeira vez, que plântulas de milho “Saracura” com dois dias de idade são tolerantes a este tipo de estresse, independente da presença do cálcio. A maior tolerância em plântulas de milho mais jovens foi observada por VanToai et al. (1995), ao verificar um declínio na sobrevivência de plântulas com três dias ou mais, após 48 horas de anoxia. Ao mesmo tempo, Andrews et al. (1994) constataram que a atividade da desidrogenase alcoólica em plântulas de milho com até três dias após a embebição com água foi fortemente induzida, ao passo que plântulas com até cinco dias dependiam de um pré-tratamento hipóxico. Para esses autores a manutenção da atividade dessa enzima é considerada fundamental na sobrevivência à submersão.

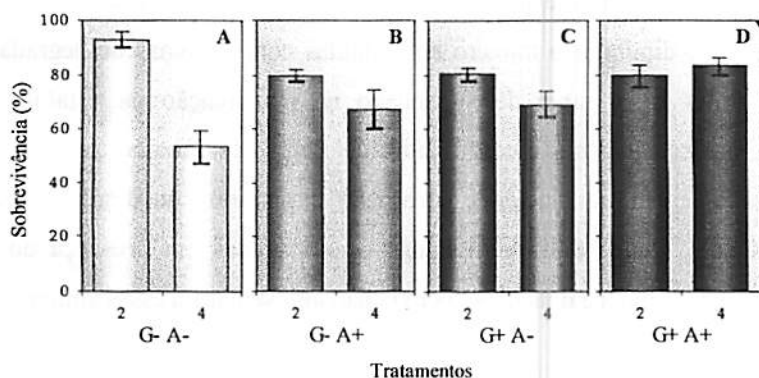



FIGURA 5. Sobrevivência à hipoxia de plântulas de milho “Saracura” com dois (2) e quatro (4) dias de germinação. A: germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); B: germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); C: germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e D: germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.



Estudando o comportamento de plântulas de milho “Saracura” à hipoxia, Vitorino et al. (2001) relacionaram a diminuição da sobrevivência ao alagamento à intensa lise celular ocorrida na região do mesocótilo, um pouco acima do colo. Tal região tornava-se translúcida e flácida com o prolongamento do estresse, formando uma forte constrição, responsável pelo tombamento e morte das plântulas. O amolecimento da região do mesocótilo, em plantas de milho, foi observado anteriormente por Saab & Sachs (1996), que sugeriram que a hipoxia provoca desarranjos dos componentes da parede celular. Entretanto, ao analisar a influência do cálcio, Vitorino et al. (2001) verificaram que a presença desse elemento na germinação promoveu um aumento na sobrevivência. Essa ação mais eficiente, quando esse íon esteve presente também no alagamento, a exemplo do que aconteceu no atual trabalho.

Alto índice de sobrevivência na presença do cálcio também foi observado por Gouvêa (2001), que atribuiu a inibição do crescimento ao baixo potencial osmótico da solução. Concomitantemente, o cálcio presente no tampão de alagamento diminuiu o número de plântulas com sintomas de degradação de parede celular pelo papel desempenhado na manutenção da estabilidade da parede. Esses resultados são confirmados pelo presente trabalho, ao passo que os sintomas de região translúcida e constrição diminuíram ou desapareceram nas plântulas com quatro dias, germinadas e/ou alagadas em presença do cálcio. Entretanto, plântulas de dois dias “per si” não apresentaram esses sintomas.



### **4.3 Influência do cálcio no crescimento e no metabolismo de carboidratos nas plântulas do milho "Saracura" durante o período de estresse hipóxico e na recuperação pós-hipoxia**

A adição de cálcio no papel de germinação reduziu drasticamente o ganho de massa seca das plântulas somente no quarto dia de germinação (Figura 6B e D). Ao serem submetidas à hipoxia, as plântulas apresentaram decréscimos na massa seca, tanto de parte aérea (Figura 6A e 6B) quanto de raiz (Figura 6C e 6D), independente da idade ou da presença do cálcio. Essa perda provavelmente indica uma utilização de elementos estruturais na manutenção da sobrevivência durante o estresse. Em estudos com *Sebastiania commersoniana*, Kolb et al. (1998) observaram valores inferiores de massa seca nas raízes e na parte aérea das plantas alagadas, em relação às plantas controle, demonstrando que não ocorreu desenvolvimento durante o alagamento. Alguns autores relataram que somente o arroz tem a capacidade de alongar o coleóptilo em condições de alagamento (Hanson & Jacobsen, 1984; Perata et al., 1992).

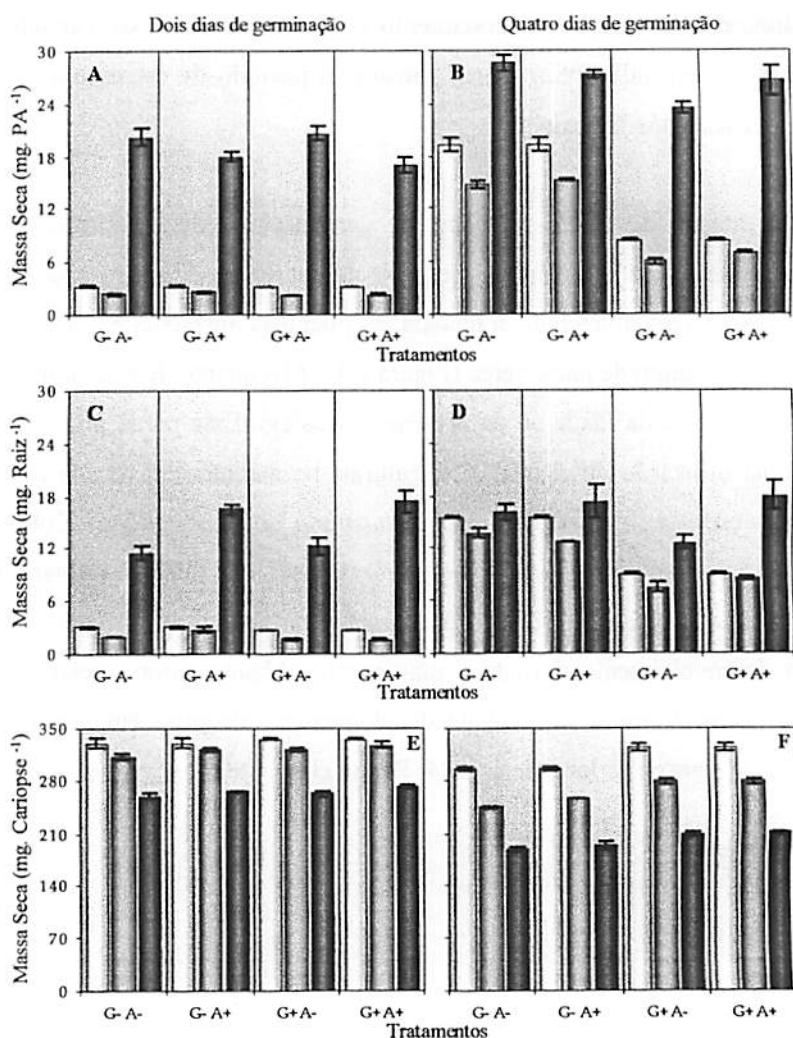


FIGURA 6. Massa seca da parte aérea (A e B), raiz (C e D) e cariopse (E e F) de plântulas de milho "Saracura" após dois (A, C e E) e quatro dias (B, D e F) de germinação (□); três dias de alagamento (■) e cinco dias de sobrevivência (■). Germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Após o alagamento, as plântulas foram submetidas a um período de sobrevivência, caracterizado pela recuperação do estresse. Quando analisadas parte aérea e raiz de plântulas de quatro dias de germinação (Figuras 6B e 6D), observou-se que o peso de massa seca no final do período de sobrevivência foi pouco superior ou semelhante àquele observado em plântulas de dois dias (Figuras 6A e 6C), apesar de essas últimas terem saído do período de estresse muito menores. O cálcio não afetou o acúmulo de massa seca pós-hipoxia na parte aérea de plântulas com dois dias de germinação submetidas ao alagamento (Figura 6A). Entretanto, quando comparada à presença do cálcio em plântulas de quatro dias de germinação e três dias de alagamento (Figura 6B), observou-se, no período de sobrevivência, um aumento médio em massa seca de 87% na ausência total do cálcio (G- A-) ou quando o cálcio esteve presente somente no alagamento (G- A+). Porém, quando o cálcio foi fornecido apenas na germinação (G+ A-), ou em ambas as situações (G+ A+), esse aumento foi de 288%. Nas raízes dessas plântulas, a presença do cálcio promoveu um aumento gradativo no acúmulo de massa seca durante a sobrevivência (Figura 6D).

Pode ser observado, na ausência total do cálcio (G- A-) e quando este esteve somente no alagamento (G- A+), praticamente apenas a recuperação da massa seca perdida no período de estresse, sendo um pouco maior no segundo caso. Entretanto, quando somente a germinação ocorreu na presença do cálcio (G+ A-), houve um aumento de 70% na massa seca de raiz no período de sobrevivência. Enquanto que, quando o cálcio esteve presente em ambas as situações (G+ A+), esse aumento foi de 112%. Ao mesmo tempo, pode ser observado que a presença do cálcio no tampão de alagamento (G- A+; G+ A+) promoveu maior acúmulo de massa seca nas raízes durante a sobrevivência quando relacionada aos seus respectivos tratamentos alagados sem cálcio (G- A-; G+ A-) (Figura 6C e 6D).

O maior acúmulo de massa seca pode ser resultado do aparecimento do maior número de raízes adventícias, observado durante o experimento, cuja formação pode estar relacionada à presença do cálcio no alagamento. De maneira geral, observa-se que, para diversas culturas, o cálcio induz a formação desse tipo de raízes quando comparadas com aquelas crescidas em solos deficientes nesse elemento (Marschner, 1986). Esses resultados mostram que a presença do cálcio em plântulas de quatro dias, principalmente no período de germinação, promove uma recuperação mais rápida dos danos causados no período de estresse hipóxico, permitindo maior utilização de compostos carbonados no crescimento da plântula. A rápida recuperação e posterior crescimento ocorrem em plântulas de dois dias de germinação, independente da presença do cálcio.

A massa seca de cariopse após a germinação, após o alagamento e após a sobrevivência, mostrou-se maior nos tratamentos de dois (Figura 6E) que nos de quatro dias (Figura 6F) de germinação. Entretanto, a degradação das reservas do endosperma durante o período de alagamento, de plântulas de quatro dias de germinação, foi muito maior que naquelas de dois dias, independentemente da presença do cálcio. Sendo assim, a atuação benéfica do cálcio, mais uma vez, parece estar relacionada ao efeito estrutural.

Ao final do período de alagamento, os teores de amido nos endospermas de cariopses germinadas durante dois (Figura 7A) ou quatro dias (Figura 7B) foram semelhantes entre si, independente da presença do cálcio. Plântulas de dois dias de germinação utilizaram com maior intensidade as reservas de amido que plântulas de quatro dias. Conseqüentemente, a maior redução da massa seca de cariopses de plântulas de quatro dias (Figura 6F) indica a utilização de outras reservas na manutenção da plântula durante o estresse, como, por exemplo, lipídeos.

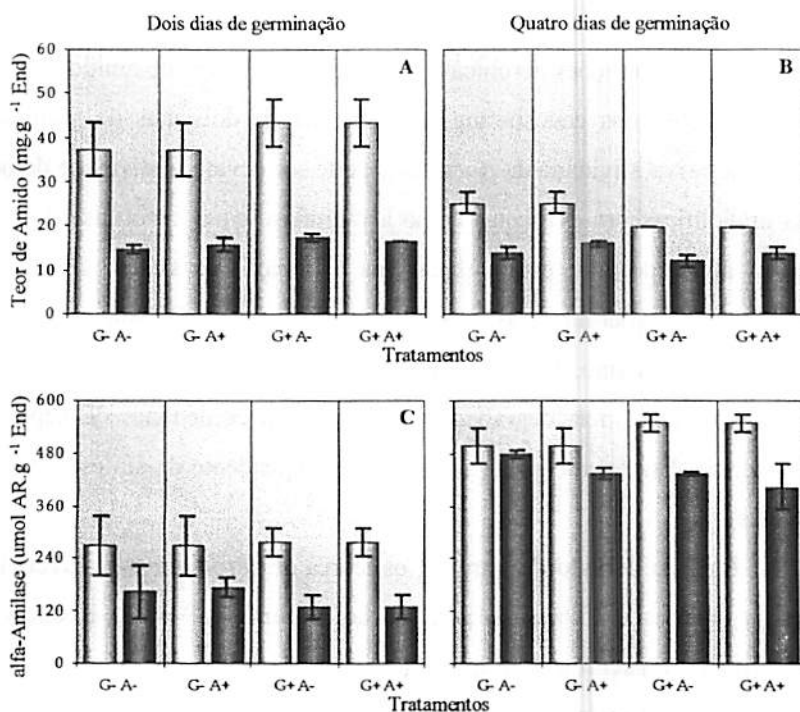


FIGURA 7. Teor de amido (A e B) e atividade da  $\alpha$ -amilase (C e D) em endospermas de cariopses de milho "Saracura" após dois (A e C) e quatro dias (B e D) de germinação ( $\square$ ) e três dias de alagamento ( $\blacksquare$ ). Germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Apesar dos endospermas apresentarem teores semelhantes de amido após o alagamento, a atividade da  $\alpha$ -amilase nesse tecido, que já era superior após os quatro dias de germinação, assim permaneceu durante o estresse (Figura 7C e 7D). Entretanto, em endospermas de sementes que germinaram na presença do cálcio, o alagamento reduziu a atividade dessa enzima. Em endospermas de arroz, resultados semelhantes foram observados por Guglielminetti et al. (1995).

Segundo esses autores, sob anoxia, a atividade da  $\alpha$ -amilase apresentou-se menor do que em condições aeróbicas. A redução nos teores de amido observada após o alagamento nos endospermas de sementes de dois dias de germinação, relacionada à baixa atividade da  $\alpha$ -amilase, pode ser devido à atividade de outras enzimas amilolíticas pré-existentes como a  $\beta$ -amilase e/ou fosforilase do amido. Essa baixa atividade pode estar relacionada à inibição da síntese de  $\alpha$ -amilase durante o estresse (Perata et al., 1993), em trigo e cevada, sob condições de anoxia. Ao mesmo tempo, Todaka et al. (2000) observaram que a  $\beta$ -amilase foi a principal responsável pela degradação de amido em cotilédones de pepino sob estresse hídrico. Esse aumento na atividade foi dependente da síntese “de novo” de proteínas.

Ao final do período de estresse, os teores de carboidratos solúveis foram menores ou iguais aos do final da germinação (Figuras 8, 9 e 10). Reduções nos níveis de frutose e sacarose em ápices de raízes de milho durante o período de anoxia foram observadas por Ricard et al. (1998). Apesar de não haver diferenças entre os teores de amido, os teores de açúcares solúveis totais, ao final do período de estresse, foram maiores nos endospermas de cariopses de quatro dias de germinação quando comparados aos teores naqueles de dois dias (Figuras 8A e 8B). Ao mesmo tempo, o cálcio não exerceu influência nos açúcares solúveis totais nem nos açúcares redutores (Figura 8). Entretanto, estes últimos não variaram em função da idade (Figura 8C e 8D). Comparando esses resultados com os teores de amido, pode-se sugerir que, durante o alagamento, plântulas de dois dias estão translocando maior quantidade de reservas de carboidratos que plântulas de quatro dias. Desse modo, o fator de tolerância existente em plântulas de dois dias pode estar relacionado ao transporte de compostos carbonados, provindos, principalmente do amido, do endosperma para a plântula.

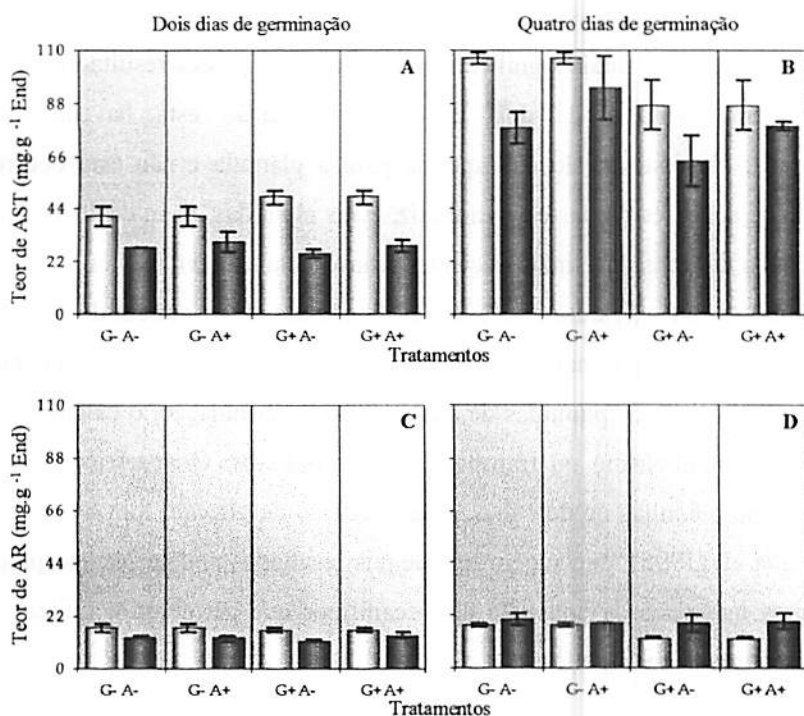


FIGURA 8. Teor de açúcares solúveis totais (A e B) e teor de açúcares redutores (C e D) em endospermas de plântulas de milho “Saracura” após dois (A e C) e quatro dias (B e D) de germinação (□) e três dias de alongamento (■). Germinação sem cálcio e alongamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alongamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alongamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alongamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Na parte aérea, os teores de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores, após o período de estresse, foram maiores nas plântulas de quatro dias de germinação (Figura 9). A presença do cálcio praticamente não teve influência. Por outro lado, nas raízes, não houve diferença nos teores desses carboidratos entre dois e quatro dias (Figuras 10). Entretanto, a aplicação de cálcio durante os quatro dias de germinação e o alongamento na presença deste

elemento (G+ A+) sobressaiu-se em relação aos demais, apresentando um teor de açúcares solúveis totais significativamente superior. Estes resultados indicam que, se em plântulas de dois dias de germinação está havendo maior translocação de reservas do endosperma para a plântula e não está ocorrendo acúmulo de açúcares na parte aérea e raiz, essas plântulas, além de apresentarem mecanismos de transporte mais eficientes, conseguem utilizar melhor as reservas para a sua manutenção durante a hipoxia. Sendo assim, ao saírem do período de estresse, recuperam-se mais rapidamente. Entretanto, apesar de aumentar a tolerância à hipoxia de plântulas de quatro dias de germinação, o cálcio não está atuando no metabolismo ou transporte de carboidratos. O aperfeiçoamento na tolerância de plântulas de dois dias, após a adição de glicose, foi observado por VanToai et al. (1995), que sugeriram que tais resultados podem ser interpretados como uma indicação da operação de mecanismos que permitam a utilização de glicose sob condições anóxicas.



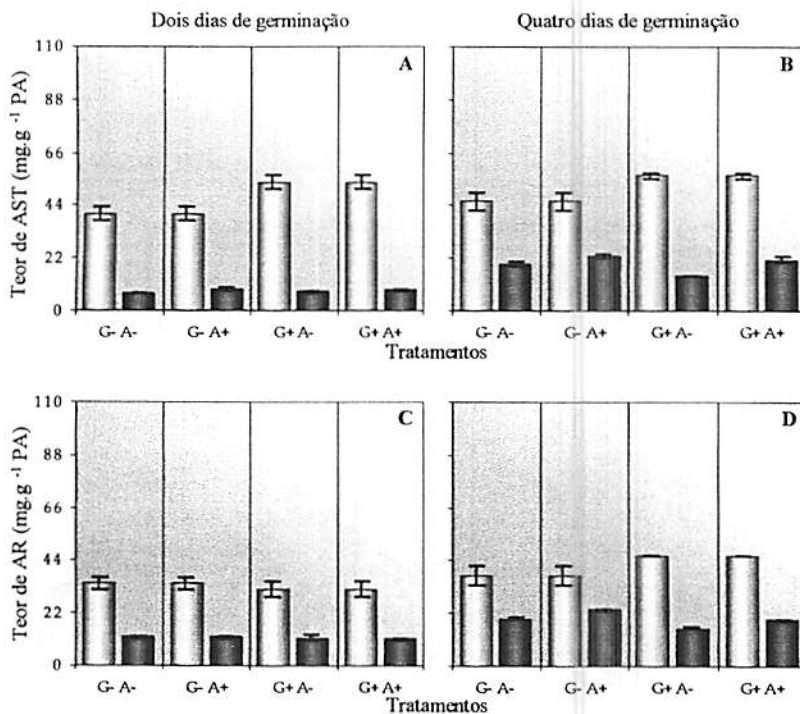


FIGURA 9. Teor de açúcares solúveis totais (A e B) e açúcares redutores (C e D) em parte aérea de plântulas de milho “Saracura” após dois (A e C) e quatro dias (B e D) de germinação (□) e três dias de alagamento (■). Germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

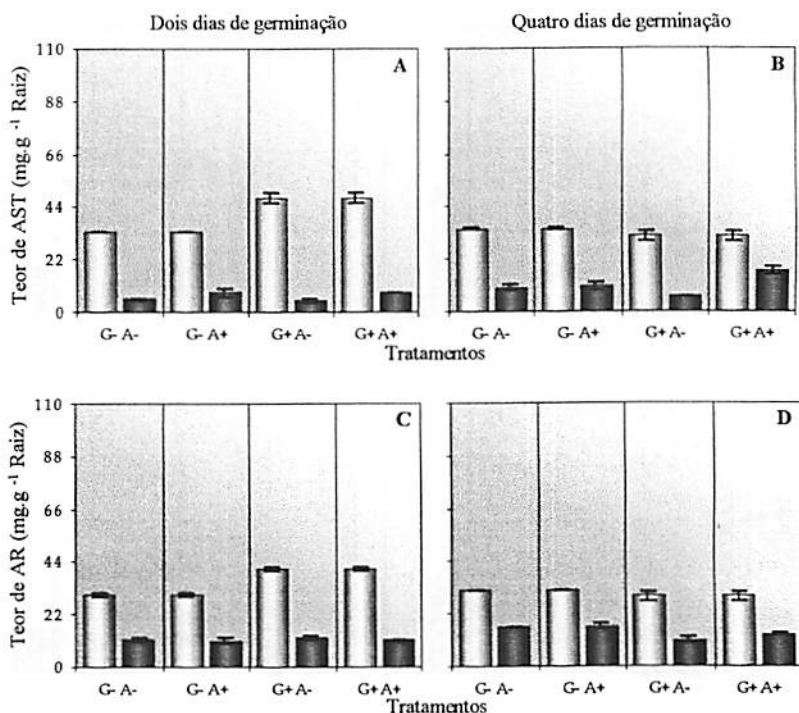


FIGURA 10. Teor de açúcares solúveis totais (A e B) e açúcares redutores (C e D) em raiz de plântulas de milho “Saracura” após dois (A e C) e quatro dias (B e D) de germinação (□) e três dias de alagamento (■). Germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Assim como os teores de carboidratos solúveis diminuíram durante o alagamento, a atividade total das invertases sofreu uma redução brusca ao final do estresse (Figura 11 e 12), independente da presença do cálcio. Em plântulas de dois dias de germinação, essa redução chegou a 66% na parte aérea (Figura 11A) e 86% na raiz (Figura 12A) e em plântulas de quatro dias de germinação essas reduções chegaram a 92% na parte aérea (Figura 11B) e 91% na raiz

(Figura 12B). Ao aplicar um pré-tratamento hipóxico em plântulas de milho, Ricard et al. (1998) observaram uma redução na atividade da invertase e um aumento nas atividades da sintase da sacarose e da hexocinase. Considerando, nas plântulas em estudo, o descarregamento do floema de forma simplástica, os mesmos autores sugeriram que, se o descarregamento fosse no apoplasto, a invertase ácida da parede celular hidrolisaria a sacarose, permitindo a importação de hexoses para dentro das raízes. Sendo assim, o pré-tratamento hipóxico em duplo-mutantes, que não expressam a sintase da sacarose, teria sido eficiente na tolerância à anoxia. Esses resultados indicam que, sob hipoxia ou anoxia, a atividade das invertases não está relacionada com a tolerância ao estresse.

Dentre as três invertases, a mais afetada pelo estresse foi a invertase ácida do vacúolo, chegando a sofrer uma redução em torno de 90% em sua atividade durante o alagamento (Figuras 11 e 12). Porém, em plântulas de dois dias de germinação (Figuras 11A e 12A), observou-se, principalmente em parte aérea, que, após a hipoxia, a redução das invertases neutra do citosol e ácida da parede celular não foi tão expressiva quanto em plântulas de quatro dias de germinação (Figuras 11B e 12B). Sendo assim, tais enzimas poderiam estar relacionadas à tolerância à hipoxia em plântulas de dois dias.

Quanto ao cálcio no período de alagamento, os resultados demonstram que ele não teve influência significativa na atividade total das invertases, o que poderia comprovar a sua não participação nos processos comandados por essas enzimas, relacionados com o mecanismo de tolerância em plântulas mais velhas.

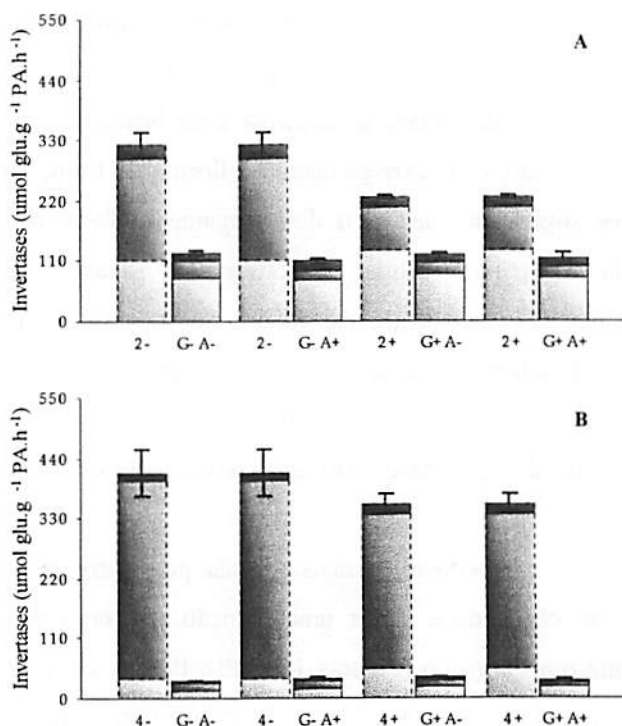


FIGURA 11. Atividade total das invertases em parte aérea de plântulas de milho “Saracura” após dois (A) e quatro dias (B) de germinação (bordas pontilhadas) e três dias de alagamento (bordas contínuas). Dois e quatro dias de germinação em papel embebido em água (2-; 4-) ou em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v) (2+; 4+); germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). Invertase neutra do citosol (□), invertase ácida do vacúolo (■) e invertase ácida da parede celular (■). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

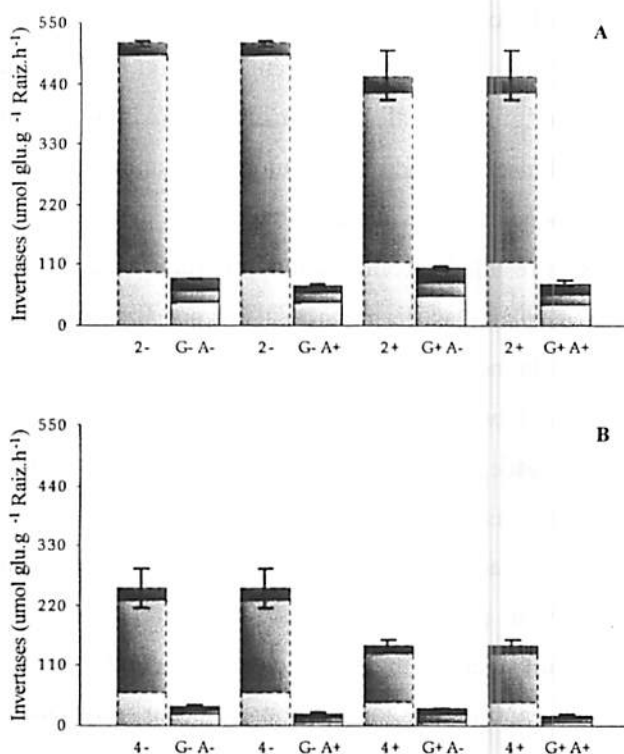


FIGURA 12. Atividade total das invertases em raiz de plântulas de milho “Saracura” após dois (A) e quatro dias (B) de germinação (bordas pontilhadas) e três dias de alagamento (bordas contínuas). Dois e quatro dias de germinação em papel embebido em água (2-; 4-) ou em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v) (2+; 4+); germinação sem cálcio e alagamento sem cálcio (G- A-); germinação sem cálcio e alagamento com cálcio (G- A+); germinação com cálcio e alagamento sem cálcio (G+ A-) e germinação com cálcio e alagamento com cálcio (G+ A+). Invertase neutra do citosol (□), invertase ácida do vacúolo (■) e invertase ácida da parede celular (■). A barra indica o erro padrão da média. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Ao analisar plântulas de milho de cinco a sete dias de germinação, submetidas a tratamentos com baixo teor de oxigênio, Zeng et al. (1999) observaram uma diminuição brusca na atividade da invertase ácida do vacúolo nas primeiras horas de anoxia ou hipoxia, estabilizando em seguida para níveis

mais baixos que sob condições aeróbicas. O mesmo comportamento foi apresentado pela sintase da sacarose, porém após um rápido declínio, essa enzima recuperou sua atividade alcançando níveis próximos ou superiores aos encontrados em aerobiose. Segundo esses autores, a diminuição na atividade da sintase da sacarose pode contribuir no ajustamento das plântulas às condições de baixo oxigênio. Esses resultados confirmam a importância da sintase da sacarose durante a hipoxia de plântulas de milho relatada por Ricard et al. (1998). Ao mesmo tempo, Guglielminetti et al. (1995) observaram que a razão de atividade entre a sintase da sacarose e a invertase neutra do citosol, em coleóptilos de arroz de oito dias de idade, foi de 5:1 sob condições aeróbicas e 30:1 sob anoxia. Isso indica que, em ambas as condições, as duas enzimas estão atuando, porém, sob anoxia a sintase da sacarose tem maior função no compartimento citosólico. Em milho, a preferência pela via da sintase da sacarose foi confirmada pelos menores índices na atividade da invertase ácida do vacúolo (Zeng et al., 1999). Nesse trabalho, o genótipo que apresentou a menor atividade da invertase juntamente com a menor capacidade relativa de clivagem da sacarose (atividade da invertase mais atividade da sintase da sacarose) obteve o maior índice de sobrevivência.

#### **4.4 Influência do cálcio na morfologia e anatomia das plântulas de milho "Saracura"**

Durante o alagamento, observou-se que a raiz primária de plântulas que foram germinadas e alagadas na presença do cálcio sofreu morte parcial. Em função disso, após o período de sobrevivência pós-hipoxia, essas plântulas apresentaram-se com um maior número de raízes adventícias (Figura 13). Ao analisar a parte aérea, verificou-se, nessas plântulas, um maior vigor e um rápido enverdecimento e distensão das folhas. Essas características permitem concluir

que este elemento favorece a um pronto restabelecimento e posterior crescimento da plântula que sofreu deficiência de oxigênio.

O restabelecimento das plântulas de milho que apresentaram o maior índice de sobrevivência foi associado à iniciação de novas raízes adventícias (Zeng et al., 1999), sugerindo, a exemplo deste trabalho, maiores sensibilidades dos ápices das raízes primárias às baixas pressões de oxigênio. O maior número de raízes secundárias em milho (Ricard et al., 1998), raízes adventícias em *Sebastiania commersoniana* (espécie arbórea) (Kolb et al., 1998) e em gramíneas forrageiras (Baruch & Mérida, 1995) e o desenvolvimento de um sistema de raízes laterais em plantas do gênero *Trifolium* (Gibberd et al., 2001), contribuíram para uma maior tolerância ao alagamento. Ao mesmo tempo, o crescimento da raiz principal foi inibido em *Trifolium* (Gibberd et al., 2001) e a morte do ápice da raiz em milho foi indicada pelo conteúdo de ATP, enquanto o resto da plântula ainda permanecia vivo (VanToai et al., 1995).

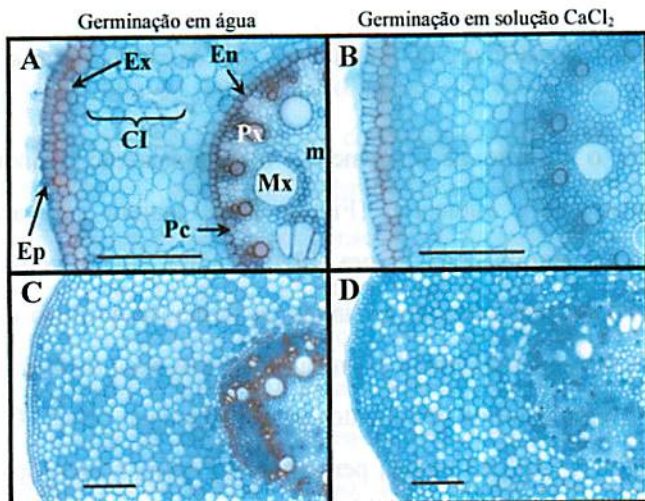


FIGURA 14. Fotomicrografias de raízes (A e B) e parte aérea (C e D) de plântulas de milho “Saracura” após quatro dias de germinação em papel embebido em água (A e C) ou em solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,75% (p/v). Ep, epiderme; Ex, exoderme; CI, córtex interno; En, endoderme; Pc, periciclo; Px, protoxilema; Mx, metaxilema; m, medula. A barra corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . UFLA, Lavras, MG, 2003.

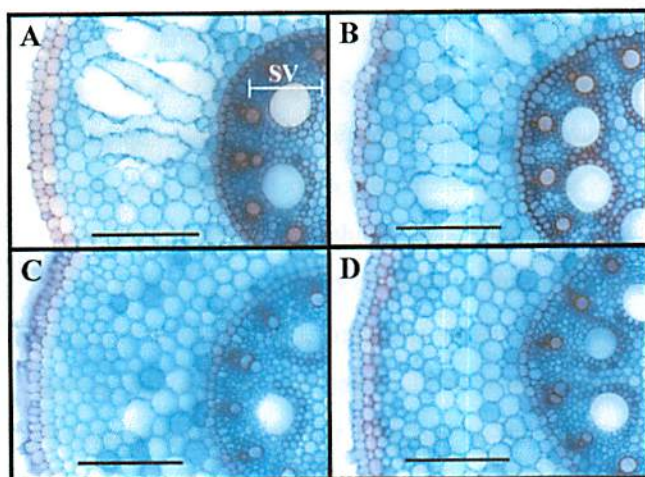


FIGURA 15. Fotomicrografias de raízes de plântulas de milho “Saracura”. A: germinado e alagado sem cálcio (G- A-); B: germinado sem cálcio e alagado com cálcio (G- A+); C: germinado com cálcio e alagado sem cálcio (G+ A-); D: germinado e alagado com cálcio (G+ A+). SV, sistema vascular. A barra corresponde a 200  $\mu\text{m}$ . UFLA, Lavras, MG, 2003.



## 5 CONCLUSÕES

No período de germinação, o cálcio aumentou a degradação e translocação de reservas provenientes do amido em plântulas de quatro dias de germinação. Porém, a sua utilização foi reduzida na plântula, provocando o menor crescimento.

A atividade total das invertases aumentou na parte aérea e diminuiu na raiz, com o progresso da germinação. No período de alagamento, a atividade dessas enzimas sofreu redução brusca, independente da idade ou da presença do cálcio, comprovando a não participação desse elemento na atuação dessas enzimas. A invertase ácida do vacúolo foi a mais afetada.

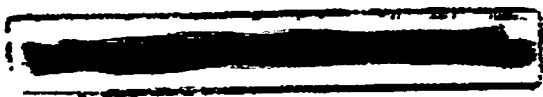
Na ausência total do cálcio, a sobrevivência das plântulas reduziu significativamente com o aumento da idade.

Plântulas de dois dias de germinação são tolerantes ao déficit de oxigênio, independente da presença do cálcio. Este fator de tolerância nessas plântulas pode estar relacionado ao transporte a partir do endosperma de compostos carbonados, provindos, principalmente, do amido. Ao mesmo tempo, utilizam melhor essas reservas para a sua manutenção durante a hipoxia.

O cálcio teve influência no aumento da tolerância à hipoxia somente em plântulas de quatro dias de germinação, ocorrendo um aumento gradativo na sobrevivência de acordo com a exposição da plântula a esse elemento.

O cálcio favorece um pronto restabelecimento e posterior crescimento da plântula que sofreu déficit de oxigênio, porém, não está atuando no metabolismo ou transporte de carboidratos em plântulas de quatro dias durante o alagamento.

O alagamento reduziu a atividade da  $\alpha$ -amilase, independente da idade, o que indica a atuação de outras enzimas amilolíticas em plântulas de dois dias.



O cálcio promoveu a formação de maior número de raízes adventícias. Este fator pode estar relacionado à maior tolerância em plântulas de quatro dias, ocasionada pela presença desse elemento.

O menor espessamento das células das raízes, na presença do cálcio, comprova a atuação desse elemento no atraso do desenvolvimento das plântulas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDREWS, D. L.; DREW, M. C.; JOHNSON, J. R.; COBB, B. G. The response of maize seedlings of different ages to hypoxic and anoxic stress. *Plant Physiology*, Rockville, v. 105, n. 1, p. 53-60, May 1994.

BARUCH, Z.; MÉRIDA, T. Effects of drought and flooding on root anatomy in four tropical forage grasses. *International Journal of Plant Science*, Chicago, v. 156, n. 4, p. 514-521, July 1995.

BRADFORD, K. J.; YANG, S. F. Physiological responses of plants to waterlogging. *Hort Science*, Alexandria, v. 16, p. 25-30, Feb. 1981.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant physiologists, 2000. Cap. 22, p. 1158-1249.

BUKATSH, F. Benerkungren zur doppelfärbung astrablausafranina. *Mikrocosmos*, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.

CAZETTA, J. O.; SEEBAUER, J. R.; BELOW, F. E. Sucrose and nitrogen supplies regulate growth of maize kernels. *Annals of Botany*, London, v. 84, n. 6, p. 747-754, Dec. 1999.

CONWAY, W. S.; SAMS, C. E.; WATADA, A. E. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. *Acta Horticulturae*, Amsterdam, v. 398, p. 31-39, 1995.

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 Agrícola*, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2001.

DEUBER, R. *Ciências das plantas daninhas: fundamentos*. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 432 p.

DICHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-520.

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.

GIBBERT, M. R.; GRAY, J. D.; COCKS, P. S.; COLMER, T. D. Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation and 'aerotropic rooting'. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 4, p. 579-589, Oct. 2001.

GOUVÊA, J. A. **Crescimento inicial e sobrevivência do milho (*Zea mays* L.), cv. Saracura BR 154, em condições de alagamento**. 2001. 33 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

HANSON, A. D.; JACOBSEN, J. V. Control of lactate dehydrogenase, lactate glycolysis, and alpha-amylase by O<sub>2</sub> deficit in barley aleurone layers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, n. 3, p. 566-572, July 1984.

HE, C.; DREW, M. C.; MORGAN, P. W. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. during hypoxia or nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 3, p. 861-865, July 1994.

HE, C.; 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.

JOHNSON, J. R.; COBB, B. G.; DREW, M. C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* Null *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 61-67, May 1994.

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, dez. 1998.

LIMA, L. C. O. Tecido esponjoso em manga "Tommy Atkins": Transformações químicas e bioquímicas no mesocarpo durante o armazenamento. 1997. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MARSCHNER, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press, 1986. 889 p.

MERGEMANN, H.; SAUTER, M. Ethylene induces epidermal cell death at the site of adventitious root emergence in rice. *Plant Physiology*, Rockville, v. 124, n. 2, p. 609-614, Oct. 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

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: REUNIÃO DE MELHORISTAS DE MILHO NA AMÉRICA LATINA, 1997, Colômbia. *Anais...* Colômbia, 1997.

PERATA, P.; GESHI, N.; YAMAGUCHI, J.; AKAZAWA, T. Effect of anoxia on the induction of  $\alpha$ -amilase in cereal seeds. *Planta*, Berlin, v. 191, n. 3, p. 402-408, Aug. 1993.

PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L.; ALPI, A. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*, London, v. 79, p. 49-56, Jan. 1997. (Supplement, A)

PERATA, P.; ROMERO, J. P.; AKAZAWA, T.; YAMAGUCHI, J. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. *Planta*, Berlin, v. 188, n. 4, p. 611-618, Dec. 1992.

PURCINO, R. P. Efeito fisiológico do cálcio na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho da variedade BRS-4154 e sua relação com o aumento da tolerância ao alagamento. 2001. 40 p. Dissertação (Mestrado)

em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RICARD, B.; VANTOAI, T.; CHOUREY, P.; SAGLIO, P. Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant. *Plant Physiology*, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1323-1331, apr. 1998.

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.

SKADSEN, R. W. Aleurones from a barley with low  $\alpha$ -amylase activity become highly responsive to gibberellin when detached from the starchy endosperm. *Plant Physiology*, Rockville, v. 102, n. 1, p. 195-203, May 1993.

SOUZA, A. L. B. Resistência pós-colheita do pêssego (*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti) a *Monilinia fructicola*: indução de respostas bioquímicas pela aplicação de  $\text{CaCl}_2$  no local da injúria. 1998. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, I. R. P. de; MAGALHÃES, P. C.; MEYER, L. E.; PIRES, N. M.; ANDRADE, C. L. T. de. Alterações morfo-fisiológicas no grão de pólen e atividade da álcool desidrogenase em milho sob diferentes frequências de encharcamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 13., 2000, Uberlândia, MG. Resumos Expandidos. . . Uberlândia: ABMS, 2000. CD-ROM.

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.; 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, 369-376, May 1994b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

TODAKA, D.; MATSUSHIMA, H.; MOROHASHI, Y. Water stress enhances  $\beta$ -amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 51, n. 345, p. 739-745, Apr. 2000.

VANTOAI, T. T.; SAGLIO, P.; RICARD, B.; PRADET, A. Developmental regulation of anoxic stress tolerance in maize. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 937-942, Aug. 1995.

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.

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.