



**EFEITO FISIOLÓGICO DO CÁLCIO NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE
PLÂNTULAS DE MILHO DA VARIEDADE BRS-
4154 “SARACURA” E SUA RELAÇÃO COM O
AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO
ALAGAMENTO**

RÚBIA PADILHA PURCINO

2001

UCAC
T

3821 7995 2000

52592

MF237235

RÚBIA PADILHA PURCINO

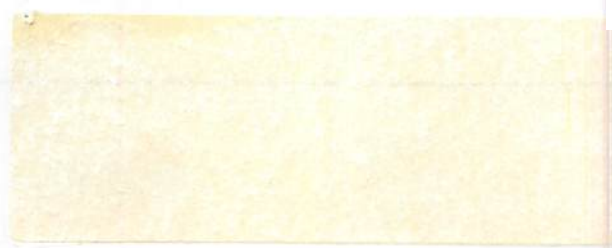
**EFEITO FISIOLÓGICO DO CÁLCIO NA GERMINAÇÃO E NO
CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO DA
VARIEDADE BRS- 4154 “ SARACURA” E SUA RELAÇÃO COM O
AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO ALAGAMENTO**

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

Orientador

Prof Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL



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

Purcino, Rúbia Padilha

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 / Rúbia Padilha Purcino . -- Lavras : UFLA, 2001.

40 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1.Milho. 2.Cálcio. 3.Germinação. 4.Hipoxia. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-633153

RÚBIA PADILHA PURCINO

**EFEITO FISIOLÓGICO DO CÁLCIO NA GERMINAÇÃO E NO
CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO DA
VARIEDADE BRS- 4154 " SARACURA" E SUA RELAÇÃO COM O
AUMENTO DA TOLERÂNCIA AO ALAGAMENTO**

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

APROVADA em 28 de agosto de 2001

Dr. Paulo César Magalhães

EMBRAPA- CNPMS

Dr. Marcelo Murad Magalhães

UFLA


Prof. Dr. José Donizeti Alves
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS- BRASIL

**Aos meus irmãos Rochelly e Eduardo ,
pelo amor e alegria que sempre me dedicam;**

Ao meu pai Eduardo e pai Romero ,

**Ao tio Bauer, tia Rita, tia Quita e Sulinha
os quais sempre me apoiaram;**

OFEREÇO

**À minha mãe, Maria Aparecida e minha avó Tiana pelo amor tão singular e
por sempre me ensinarem sobre a vida;**

**Ao meu avô, Manso (in memoriam), pois mesmo em outro plano está
sempre em meu pensamento;**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por se mostrar sempre presente em minha vida dando a ela o melhor sentido.

À minha mãe, Maria Aparecida, minha avó Tiana e aos meus irmãos Duda e Rochelly, pelo amor e carinho, e os quais são o motivo para eu querer seguir sempre em frente.

Ao Prof. José Donizeti Alves, pela orientação, amizade e principalmente por ter me dado a oportunidade de ver o mundo científico de forma não conhecida antes.

Ao co-orientador Dr. Marcelo Murad Magalhães, pela amizade e dedicação durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Dr. Antônio Álvaro pelo incentivo constante.

Aos professores do curso de Fisiologia Vegetal: Luiz Edson Mota de Oliveira, Renato Paiva, Angela Maria Soares, Amauri Alves Alvarenga, Nelson Delú Filho pelos preciosos conhecimentos transmitidos.

À Prof^a Lizete Chamma Davide, Ana Hortênsia e a todos do laboratório de citologia pela preciosa ajuda.

Aos funcionários Lena, Odorêncio, Joel, Mauro, Evaristo, Dartagnam e Izonel pela agradável convivência.

À Cíntia, Ana Rita, Iara, Sílvia e Dani, minha família aqui em Lavras, e as quais foram parceiras na "Eficiência", pela grande amizade e maravilhosa convivência que guardarei em minha lembrança com muito carinho.

Ao Dr. Léo, pela amizade incondicional, valiosos "Pitacos" e pela presença sempre protetora.

Ao amigo Gustavo, pelas alegres idéias, ranhetas, o qual me fez discutir idéias.

Ao amigo e estagiário de iniciação científica, Thiago pela ajuda e dedicação durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Às amigas Vânia e Fernanda pela alegria, tornando o ambiente sempre agradável.

À amiga Vanessa pela amizade e apoio mesmo estando distante.

Aos amigos da turma do mestrado, Cíntia, Sílvia Zanela, Luciano, Fabiano e Lucinéa, pela amizade e companheirismo .

Às amigas Marina, Liliam e Edna, pela amizade e pelas longas e divertidas conversas.

Aos Artiaga, Jorge, Breno, Ranieri pela amizade.

Aos demais colegas do curso de Fisiologia Vegetal pelo agradável convívio.

Aos meus primos, Maurício, Maurilho, Bauer, Marquinhos e todos os demais da Família do firimfimfim.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

'A todos MUITO OBRIGADA!!!!!!

BIOGRAFIA

RÚBIA PADILHA PURCINO, filha de Maria Aparecida Padilha Tostes e José Romero Corsetti Purcino, nasceu em 04 de junho de 1976 em Janaúba-MG. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1993, concluindo-o em dezembro de 1998. Durante a realização do curso de graduação, foi monitora de Fisiologia Vegetal do departamento de Biologia da UFRRJ sob orientação dos Profrs. Nídia Majerowisk e Leonardo Oliveira Médici. Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras em setembro de 1999, concluindo-o em agosto de 2001.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5.CONCLUSÕES.....	34
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

PURCINO, Rúbia Padilha. 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. UFLA, 2001. 40p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal)¹

Recentes estudos têm demonstrado que plântulas de milho submetidas à germinação e desenvolvimento inicial em solução de cloreto de cálcio, apresentam maior sobrevivência quando em condições de anoxia. Dessa forma o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito fisiológico promovido por este sal durante a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de milho da variedade BR-154 "Saracura" bem como sua relação com o aumento da sobrevivência dessas em condições de alagamento. Para tanto em um primeiro experimento cariopses foram colocadas para germinar em papel de "germitest" embebido em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v) permanecendo em condições de ausência de luz e temperatura de 26° C por um total de 96 horas. A cada 24 horas foram retirados lotes para avaliação do desenvolvimento das plântulas, perda de matéria seca nas cariopses e alterações bioquímicas. As plântulas oriundas de germinação em solução de cloreto de cálcio apresentaram marcante redução tanto no comprimento de raízes como no comprimento dos coleóptiles. Verificou-se também que nessas condições houve um ajustamento osmótico nas plântulas, ocasionado pelo aumento na concentração de aminoácidos, principalmente, prolina. A atividade da enzima α -amilase aumentou ao longo de 96 horas após início da embebição não sendo afetada pelo cloreto de cálcio. Em um segundo experimento as cariopses e plântulas foram submetidas à diferentes tempos de exposição ao cloreto de cálcio por um total de 96 horas, tendo como controle cariopses e plântulas providas somente de germinação em água e em solução de cloreto de cálcio respectivamente. Após esse período um lote foi reservado para a avaliação da matéria seca e análises bioquímicas enquanto o outro foi destinado a avaliação da sobrevivência em condições de anoxia. Observou-se um maior efeito do cálcio na redução no crescimento nas 48 horas finais de germinação, constatado pela menor matéria seca das plântulas, quando comparadas com aquelas que não mantiveram contato com o sal nesse mesmo período. A redução do crescimento apresenta uma relação positiva com o aumento da tolerância a anoxia, pelo fato das reservas ficarem preservadas na cariopse durante o desenvolvimento inicial e quando as plântulas são submetidas ao alagamento essas são alocadas e utilizadas para manutenção do metabolismo nessas condições.

¹ Orientador: José Donizeti Alves

increase in hypoxia tolerance, based in the fact that the reserves were preserved in caryopsis during the initial growth and when the plantled were submitted to flooding, these were allocated and used to maintain the metabolism in this condition.

ABSTRACT

PURCINO, Rúbia Padilha. Calcium physiological effect in germination, initial growth, and its relation to flooding tolerance increase in maize plantlets variety BRS- 14154 Saracura. Lavras: UFLA, 2001.40p.(Dissertation - Master in Agronomy – Plant Physiology)¹

Recent studies have shown that maize plantlets submitted to germination and initial growth in calcium chloride solution, showed higher survival when in hypoxia conditions . So this paper aims to verify the physiological effect promoted by this salt during germination and initial growth of maize plantlets BRS 4154 Saracura as well as its relation with water and calcium chloride solution 0,75%(v/v) staying in this condition without light and temperature at 26° during 96hours. For each 24 hours interval sample were taken for plantlets from germination in calcium chloride showed and abrupt reduction in root and coleóptiles length. It was verified in this condition an osmotic adjustment in plantlets, caused by the increase in aminoacid concentration, mainly proline. The α - amilase activity increase during 96 hours after the embebiton beginning, and it was not affected by calcium chloride. In another experiment the caryopses and plantlet were submitted to difference exposure time to calcium chloride during 96 hours, and the controls caryopses and seedling were germinated in water and rept in calcium chloride solution respectively. After this time, part of the sample were used for dry weight evolution and biochemical analysis and the other part used for survival in hypoxia conditions. It was possible to observe a higher calcium affect in growth reduction in the final 48 hours germination, confirmed by plantlet dry weight when compared with that ones no rept in contact with the salt in the same period. The growth reduction shows a positive relation with the increase in hypoxia tolerance, based in the fact that the reserves were preserved in caryopsis during the initial growth and when the plantled were submitted to flooding, these were allocated and used to maintain the metabolism in this condition.

Adviser: José Donizeti Alves

1 INTRODUÇÃO

As condições de hipoxia e anoxia originadas no ambiente radicular, devido à baixa difusão do oxigênio, em solos alagados, são consideradas como causas determinantes da redução na produtividade das mais variadas espécies de plantas.

Ao longo do processo de evolução, algumas espécies têm desenvolvido mecanismos de adaptação, os quais as tornam tolerantes, permitindo a sobrevivência em ambientes de baixa pressão de oxigênio, por períodos não muito prolongados. Entre as plantas cultivadas, o milho é classificado como uma das mais sensíveis à condição de anoxia, de forma que, em áreas sujeitas a períodos temporários de inundação, o cultivo desse cereal é restringido.

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA(CNPMS) lançou no mercado em 1997, a variedade BR-154, comumente conhecida como "Saracura", que possui como principal característica, tolerância a períodos intermitentes de encharcamento do solo. Em parceria com o CNPMS, o setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de caracterizar os mecanismos envolvidos com a tolerância ao déficit de oxigênio dessa variedade.

Os resultados divulgados até o presente momento mostraram que em relação à variedade BR-107, a BR-154 "Saracura" apresentou-se altamente tolerante, quando submetida a condições experimentais de hipoxia, comprovando o desempenho no campo, durante o processo de seu melhoramento genético. Após 4 dias de hipoxia, a BR-107 mostrou sua sensibilidade à deficiência de oxigênio no meio, apresentando taxa de sobrevivência próxima de zero. Nesse mesmo período, a sobrevivência do BR-154 "Saracura" foi de 75% (Vitorino, 1999).

Essas pesquisas mostraram, também que o fornecimento exógeno do cálcio, durante o período de germinação, prolongou a sobrevivência de ambas as variedades durante o alagamento, retardando a degradação da parede celular. Esta foi apontada como sendo a causa primária da degenerescência das plântulas a períodos prolongados do estresse (Vitorino, 1999; Dantas, 1999). Ficou constatada, nestes trabalhos, a necessidade de pesquisas futuras envolvendo o cálcio como elemento estrutural importante na tolerância ao alagamento.

Posteriormente, foi verificado que as plântulas oriundas de germinação em papel 'germitest', embebido em solução de cloreto de cálcio, têm o crescimento reduzido de forma marcante, quando comparadas àquelas germinadas somente em água (Gouvêa, 2001). A adição de cloreto de cálcio leva a uma redução no potencial hídrico do meio, devido ao aumento do componente osmótico, o que atua diretamente nos diversos processos bioquímicos e fisiológicos relacionados com o processo germinativo.

Pelo exposto, objetiva-se no presente trabalho, verificar o efeito do cálcio na germinação e no crescimento inicial das plântulas de milho da variedade BR-154 "Saracura", tentando relacionar esses fatores com o aumento da sobrevivência durante a condição de hipoxia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Solos que possuem altos níveis de compactação, drenagem deficiente, sujeitos a alto regime pluvial e sistemas de irrigação inadequados, apresentam problemas de aeração, que resultam em condições de hipoxia ou anoxia no ambiente radicular, caracterizadas pela baixa pressão ou ausência de oxigênio, respectivamente. Plantas que se desenvolvem nessas condições têm o crescimento vegetativo e reprodutivo reduzidos significativamente (Moraes et al., 2001; Koslowski e Pallardy, 1984), de forma que a permanência prolongada, sob deficiência de oxigênio pode levá-las à morte. Em baixa pressão de oxigênio, a expressão gênica é alterada (Chang et al., 2000), e os produtos desses genes induzem mudanças metabólicas e/ou morfológicas que permitem a sobrevivência das plantas, por períodos de tempo não muito prolongados (Armstrong et al., 1994; Alves et al., 2000).

O metabolismo celular em situações de déficit de oxigênio é desviado para a via anaeróbica, a qual apresenta inconvenientes como o menor rendimento de energia, pela reduzida quantidade de ATP produzidos (Vartapetian e Jackson, 1997) e a geração de produtos finais considerados tóxicos para a célula como, por exemplo, etanol e acetaldeído (Gancedo e Serrano, 1989). A leve acidificação do citoplasma, em decorrência da presença do lactato (Davis et al., 1974), e elevada extrusão de H^+ , devido ao funcionamento precário das ATPases-transportadoras do tonoplasto (Saint-ges et al., 1991), têm sido apontadas como causas determinantes da morte celular sob anoxia (Drew, 1997).

De maneira geral, plantas tolerantes a essas condições de estresses, possuem consideráveis reservas acompanhadas de eficiente utilização de carboidratos (efeito Pasteur) e contínua reoxidação do NADH, de forma que seja

mantida uma produção de ATP satisfatória, capaz de garantir a funcionalidade das ATPases e a manutenção do pH próximo à normalidade (Hanhijarvi e Fagerstedt, 1994; Albrecht et al., 1997; Alves, 2000; Summres et al., 2000).

Entre os cereais cultivados, o milho tem sido considerado como uma cultura sensível à hipoxia ou anoxia, pelo fato de não apresentar mecanismos de tolerância à essas condições, o que torna o seu cultivo inadequado, em regiões que apresentem excesso temporário de água no solo. O Centro Nacional de Pesquisa de milho e Sorgo, há quinze anos vem selecionando a variedade BR-154 “Saracura”, lançada no mercado em 1997, a qual possui como principal característica, a tolerância a períodos intermitentes de encharcamento do solo (Parentoni et al., 1996). Apesar de considerada tolerante, nenhum mecanismo relacionado a essa tolerância foi estudado até o ano de 1999, quando em parceria com a EMBRAPA (CNPMS), um grupo do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA começou a desenvolver pesquisas com o objetivo de melhor caracterizar a tolerância a condições de déficit de oxigênio apresentada por essa variedade.

O trabalho pioneiro foi desenvolvido por Vitorino (1999), onde foi verificado que plântulas de milho “Saracura”, quando submetidas a condições experimentais de anoxia por períodos de 1, 2, e 3 dias, apresentaram índices percentuais de sobrevivência de 15, 43 e 42%, respectivamente, resultados superiores à variedade BR-107, classificada como sensível a essa condição. Constatou-se, também, que as plântulas consideradas como não viáveis apresentam no mesocótilo uma região translúcida, característica de sintoma de lise celular, a qual evolui para uma constrição com o prolongamento do período de anoxia, levando-as à morte. Paralelamente, Dantas (1999) realizando pesquisas para investigar a formação da principal adaptação anatômica à condição de déficit de oxigênio, os aerênquimas, constatou que a variedade BR-154 “Saracura”, após 12 horas de hipoxia apresentou cerca de 12% da área do córtex das raízes ocupada por esses espaços intercelulares, os quais chegaram,

após quatro dias, a preencher cerca de 50% dessa área. Nesse mesmo período, nos coleóptiles, esses espaços apresentaram-se de forma significativa ocupando 15% da área.

Vitorino (1999) e Dantas (1999), adicionando cloreto de cálcio ao papel de germinação e no tampão de alagamento, mostraram que a sobrevivência das plântulas, tanto da variedade BR-154 "Saracura" como da BR-107, sofre consideráveis aumentos, quando submetidas às condições de hipoxia. Esse aumento na sobrevivência foi atribuído pelos autores à presença do cálcio atuando como elemento estrutural, conferindo maior resistência à parede celular.

A função do cálcio como elemento estrutural, participando de ligações covalentes entre os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos (Damarty et al., 1984; Grant et al., 1973), constituintes da parede celular, têm sido objeto de vários estudos, uma vez que, ao contrário de outros elementos, é o único que possui atividade apoplástica (Selling et al., 2000). Nas áreas de pós-colheita e fitopatologia, os efeitos benéficos do cálcio têm sido muito bem caracterizados, pois as ligações intermediadas por esse elemento tornam a parede celular menos acessível às enzimas responsáveis por sua degradação, além de representar uma barreira física ao ataque de microrganismos (Conway, e Watada, 1995; Siddiqui e Bangerth, 1996).

Outra importante função do cálcio na fisiologia das plantas é a sua participação como mensageiro secundário em resposta as mais diferentes condições de estresse (Hepler e Wayne, 1985; Smallwood, Calvert e Bowls 1999). Em deficiência de oxigênio, a variação na concentração citoplasmática desse cátion precede a expressão de genes que codificam para peptídeos anaeróbicos (Subbaiah et al., 1994a). Existem relatos na literatura que após dois minutos em condições de anoxia ocorre uma elevação na concentração citoplasmática desse elemento (Subbaiah et al., 1994b).

Dando continuidade aos trabalhos de caracterização da tolerância da variedade BR-154 “Saracura” ao alagamento, Gouvêa (2001) verificou que a adição de cloreto de cálcio, além de aumentar a sobrevivência das plântulas quando submetidas a hipoxia, promove, também, redução do desenvolvimento das mesmas. Os resultados da análise de crescimento das plântulas, em soluções de diferentes composições osmóticas mostraram reduções no crescimento de raízes na ordem de 18 e 37%, com a adição de manitol e cloreto de cálcio respectivamente. Dessa forma, esse autor, além de reafirmar o papel do cálcio como elemento estrutural, mostrou a existência de um forte efeito osmótico atuando na redução do crescimento e no prolongamento da tolerância da variedade BR-154 “Saracura” às condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

A adição de cloreto de cálcio 0,75 % (p/v) à solução de germinação promove a redução do potencial hídrico do ambiente de germinação para valores em torno de -0,25 MPa, de forma que o gradiente de potencial hídrico entre a semente e o meio é alterado, assemelhando-se a uma condição de germinação sob déficit hídrico. Em condições de baixos potenciais hídricos, os eventos metabólicos associados aos processos de germinação e crescimento inicial das plântulas, de maneira geral, são atrasados ou até mesmo inibidos pela redução nas taxas de hidrólise e utilização das substâncias de reservas por deficiência hídrica celular (Koller e Hadas, 1982; Bewley e Black, 1994).

O ajustamento osmótico, resultante do acúmulo de solutos osmoticamente ativos nas células, como as betaínas, carboidratos solúveis e aminoácidos (Mcneil et al., 1999) é um dos mais complexos e eficientes mecanismos desenvolvidos pelas plantas, para a manutenção de um “status” hídrico favorável ao seu desenvolvimento, quando em condições de baixo potencial hídrico (Yancey et al., 1982). A prolina, dentre os aminoácidos, tem sido apontada como a principal promotora desse mecanismo, uma vez que, o seu

acúmulo no citoplasma não provoca alterações no metabolismo e na estrutura celular (Borggess et al., 1976; Samaras et al., 1995; Versleus e Sharp, 1999).

Com base nesses conhecimentos é possível sugerir que a adição de cloreto de cálcio estimule tanto um feito osmótico como estrutural, durante a germinação e crescimento inicial das plântulas, levando a alterações na distribuição de reservas durante essas fases (Gouvêa, 2001). Apesar de sugerir essa possibilidade, esse autor não realizou nenhum estudo para verificar de que forma o cálcio atua na distribuição de reservas e a relação desse fato com o aumento da sobrevivência das plântulas quando em condições de hipoxia.

Uma hipótese que merece maiores investigações é que, ao atuar reduzindo o crescimento das plântulas, cálcio atue também na distribuição das reservas, fato que pode ser de grande importância, no estudo da tolerância ao alagamento quando na presença do cálcio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Cariopses de milho, da variedade BR-154 "Saracura", lançada pelo Centro Nacional de Milho e Sorgo, no ano de 1997, foram envolvidas em papel 'germitest' embebidos em água e cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,75% (p/v), respectivamente, onde permaneceram por um total de 96 horas no escuro à $26 \pm 2^\circ\text{C}$. A cada 24 horas, foram retirados lotes, para a avaliação da perda de matéria seca da cariopse, desenvolvimento das plântulas e alterações bioquímicas.

Em um segundo experimento, dois lotes de cariopses foram colocados em papel 'germitest', embebidos em água e solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v), sendo transferidas após 24 e 48 horas, para papel embebido em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v) e água respectivamente. Para obtenção de um controle, colocaram-se cariopses em papel embebido somente em água e somente em solução de cloreto de cálcio. Após 96 horas do início da germinação, foram analisadas em um lote de cariopses e plântulas, a matéria seca e alterações bioquímicas.

O segundo lote de plântulas foi destinado à avaliação da sobrevivência ao alagamento. Para tanto, quatro rolos de papel foram colocados em tubos de PVC, contendo 1,2 litros de tampão de alagamento constituído de tris-hidroximetilaminometano (5 mM, pH 8,0) e ampicilina (100 mg/L). Em seguida, fez-se o borbulhamento, com nitrogênio, da solução de alagamento, por 3 minutos, tendo como finalidade a diminuição da pressão de oxigênio dentro do recipiente. Após 72 horas de indução do estresse, realizou-se a avaliação da sobrevivência com base na viabilidade das plântulas, utilizando-se como referência a ausência do sintoma de lise celular, na região do mesocótilo, caracterizado por Vitorino (1999).

Para a quantificação dos açúcares solúveis totais, foi utilizada 0,5 g de matéria fresca, a qual foi macerada em 15 mL do extrator tampão fosfato pH 7,5. Em seguida, depois de centrifugadas a 10000 g por 30 minutos, recolheu-se o sobrenadante, efetuando-se uma segunda extração. A partir da combinação dos dois sobrenadantes, retirou-se alíquotas de 15 μ L, para quantificação dos açúcares solúveis totais pela reação com antrona (Diche, 1962). Uma vez procedida a incubação do meio de reação (985 μ L de água, 2 mL de antrona) em banho-maria por 12 minutos, as leituras foram realizadas em comprimento de onda de 620 nm.

Os aminoácidos livres foram quantificados pelo método da ninhidrina (Cocking e Yemm, 1954), onde alíquotas de 200 μ L do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (800 μ L de água; 0,5 mL de tampão citrato; 0,2 mL do reagente de ninhidrina e 1 mL de KCN 2 %) e, posteriormente incubadas em banho-maria a 100°C por 20 minutos, seguido da adição de 1,3 mL de etanol a 60%. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 570nm.

As proteínas solúveis totais foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se uma alíquota de 100 μ L e leitura em comprimento de onda de 595 nm.

A quantificação de prolina foi realizada de acordo com Bates (1973), utilizando-se de 0,5 g de matéria fresca homogeneizada em ácido sulfosalicílico a 3%. Após a filtragem em papel de filtro Watman n° 2, tomou-se 2 mL do filtrado, adicionando-se 2 mL de ácido de ninhidrina, fazendo-se a incubação em banho-maria a 100°C. Depois de uma hora nessa condição, a reação foi paralisada em banho de gelo. Para extração do cromóforo prolina-ninhidrina, adicionou-se 4 mL de tolueno, seguido de agitação vigorosa, por 20 segundos, sendo a leitura da fase toluênica em comprimento de onda de 520 nm.

A extração da enzima α -amilase, foi realizada pela adição de 200 μ L de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 à 50 mg de amostra, as quais foram

mantidas à 5°C por 12 horas e centrifugadas à 12.000 g por uma hora. A detecção da atividade foi feita segundo Alfenas (1998), onde 20 µL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida 7,5%, contendo 0,5% de amido solúvel. Após a eletroforese, o gel foi incubado por uma hora em 100 mL de solução tampão acetado de sódio, acrescidos 2 mL de solução de cloreto de cálcio 1 M. A revelação negativa foi conseguida pela adição de 100 mL de solução de iodo 100 mM, contendo iodeto de potássio 14 mM.

Para verificar o efeito do cálcio na divisão celular foi avaliado o índice mitótico. Para tanto, cariopses foram colocadas para germinar em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% . Após 48 horas foram coletados os ápices das raízes e fixados em Carnoy (álcool etílico absoluto e ácido acético glacial 3:1), por 24 horas e estocados em álcool 70% à 5°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram hidrolizadas em ácido clorídrico 1N a 60°C, por 12 minutos, sendo, posteriormente, coradas com o reagente de Schiff por 30 minutos. A região meristemática foi espalhada com ácido acético 45% e as lâminas montadas com entellan.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do desenvolvimento, observou-se que a adição de solução de cloreto de cálcio no papel de germinação, teve um efeito significativo na redução da matéria seca das plântulas (Figura 1A). Os dados observados de comprimento de raiz (Figura 1B) e coleóptile (Figura 1C) comprovam o menor desenvolvimento, evidenciado, principalmente, a partir de 48 e 72 horas de germinação respectivamente. Ao final do experimento, o tamanho das plântulas germinadas, na presença de cloreto de cálcio, foi cerca de três vezes menor do que daquelas cujo papel de germinação foi umedecido com água. O desenvolvimento das plântulas ao longo do período de avaliação, na ausência do cloreto de cálcio, foi acompanhado por um decréscimo da matéria seca da cariopse a partir de 72 horas (Figura 1D), período no qual observaram-se as maiores taxas de crescimento de raiz e de coleóptile nessa condição. A matéria seca da cariopse foi significativamente menor que aquela observada na presença do sal, na última avaliação. Esses resultados sugerem que, na ausência deste sal, ocorre uma maior alocação das reservas da cariopse para a plântula.

Gouvêa (2001), estudando o desenvolvimento dessa mesma variedade, em soluções de diferentes composições iônicas, quantificou reduções no crescimento das plântulas na ordem de 55 e 18%, impostas pelo umedecimento do papel de germinação com soluções de cloreto de cálcio ou magnésio e cloreto de potássio ou manitol respectivamente. Essas soluções, no entanto, não afetaram a capacidade germinativa das sementes. Esse autor sugeriu que o efeito inibitório do crescimento das plântulas pode ter ocorrido pela função apoplástica, conferida ao cálcio como um elemento estrutural de parede, adicionando-se a esta, a diminuição do potencial hídrico do meio, pela adição do cloreto de cálcio.

O efeito do cálcio como um elemento estrutural, foi explicado pela maior redução no crescimento das plântulas, quando comparadas à redução promovida pela adição de cloreto de magnésio na solução de germinação, que ao se dissociar-se, promove uma mesma concentração de eletrólitos, portanto, um mesmo efeito osmótico.

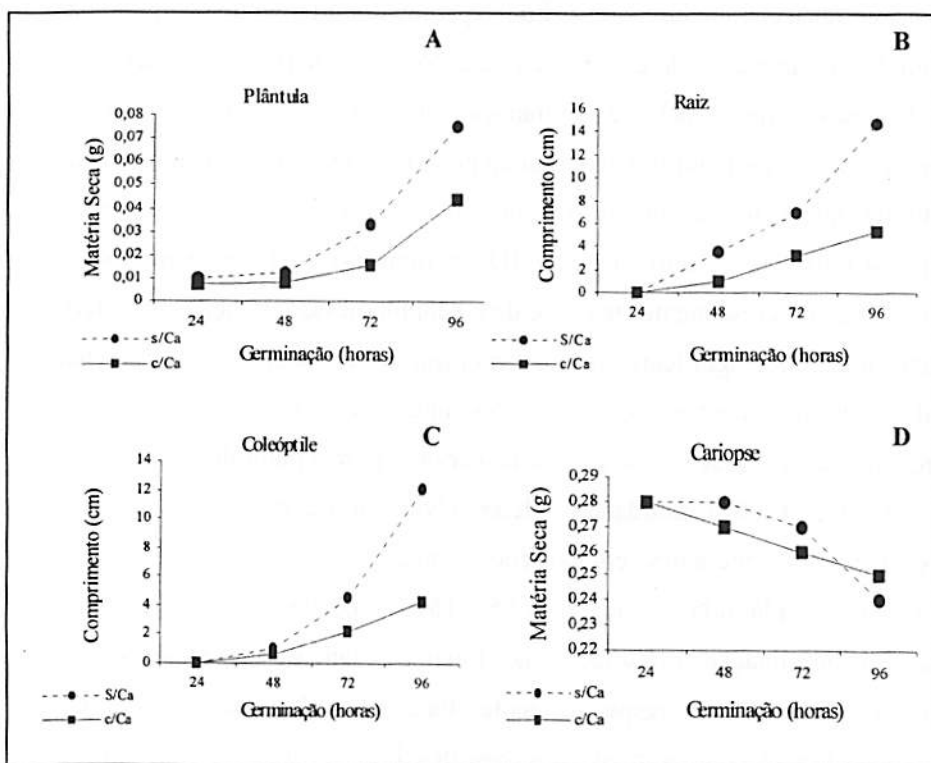


FIGURA 1. Avaliação do desenvolvimento de plântulas ao longo de 96 horas após início da embebição em papel 'germitest' em água ou em solução de CaCl_2 . Lavras - MG, agosto de 2001.

A inibição do crescimento em plantas pode ocorrer de forma indireta, direta, ou ambas simultaneamente (Deuber, 1992). A inibição indireta resulta da redução na divisão celular, enquanto a direta é promovida pela interferência de substâncias, no alongamento celular pela alteração da plasticidade da parede. Dessa forma, as paredes celulares deixam de se distender ou apresentam distensões desuniformes, que podem estar ou não vinculadas a divisão da célula (Abreu, 1997). No presente trabalho, o cálcio influenciou diretamente o crescimento celular, sem no entanto promover alterações na citocinese, uma vez que o índice mitótico total, não foi reduzido nas plântulas providas de germinação em cloreto de cálcio (Tabela 1). Mas, pode-se verificar que a fase de prófase é bastante reduzida na presença do cálcio, sendo que esse efeito é atenuado à medida que o ciclo celular evolui.

TABELA 1. Índice mitótico (T) e das fases da mitose (prófase-IP; metáfase-IM; anáfase-IA; telófase-IT) após 48 horas de embebição em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75 % (p/v). Lavras, agosto de 2001.

TRATAMENTO	ÍNDICE MITÓTICO (%)				
	T	IP	IM	IA	IT
SEM CÁLCIO	18	10	4	3	1
COM CÁLCIO	12	5,8	3	2,2	1

Dessa forma, a redução no crescimento das plântulas, em presença de cloreto de cálcio também pode ser atribuída em maior parte à participação desse íon como um elemento estrutural diminuindo a extensibilidade celular.

Já o efeito osmótico foi comprovado, ao se verificar uma drástica redução na matéria seca de raízes e parte aérea quando este autor analisou o desenvolvimento das plântulas, em solução de manitol com pressões osmóticas variando de 0 até -0,5 MPa. Em condições de baixos potenciais hídricos, a

inibição do crescimento é decorrente da redução da extensibilidade ocasionada pelo menor potencial de pressão das células das plântulas, que germinam nessas condições (Bensen, Boyer e Mullet, 1988).

Após 48 e 72 horas da germinação na presença da solução de cloreto de cálcio, ocorreu uma maior inibição do desenvolvimento da parte aérea quando comparada com o da raiz (Figura 2). Plântulas de milho conseguem manter a alongação de raízes em potenciais de até $-1,6$ MPa, ao passo que em potenciais de $-0,8$ MPa, o desenvolvimento da parte aérea é completamente inibido (Sharp et al., 1988). No presente trabalho, a adição de cloreto de cálcio reduz o potencial hídrico do meio para $0,25$ MPa, o que foi suficiente para afetar o desenvolvimento dos coleóptiles. Uma maior sensibilidade dos tecidos da parte-aérea, também foi observada em plântulas de feijão-de-corda, quando submetidas a condições de baixo potencial hídrico (Bezerra, 1996). O mecanismo que permite a manutenção do crescimento das raízes e a restrição do crescimento da parte aérea sob essas condições tem recebido pouca atenção dos pesquisadores. A maioria deles sugere a participação do ácido abscísico, que ao se acumular, inibe a síntese de etileno e, dependendo da resposta fisiológica do órgão em relação ao ácido abscísico, pode haver a promoção ou inibição do crescimento (Sharp et al., 1994; Spollen, 2000).

A menor taxa de crescimento observada nas plântulas, quando a germinação se deu em solução de cloreto de cálcio, pode estar relacionada a uma menor taxa de embebição de água pelas cariopses, nas 48 horas iniciais de germinação (Figura 3A), visto que, a adição desse sal à solução de germinação, promove a redução do componente osmótico do meio. Uma vez que não foram encontradas diferenças significativas, no conteúdo de água das plântulas, em função dos tratamentos aplicados (Figura 3B), sugere-se que a cariopse tem importância fundamental no processo germinativo.

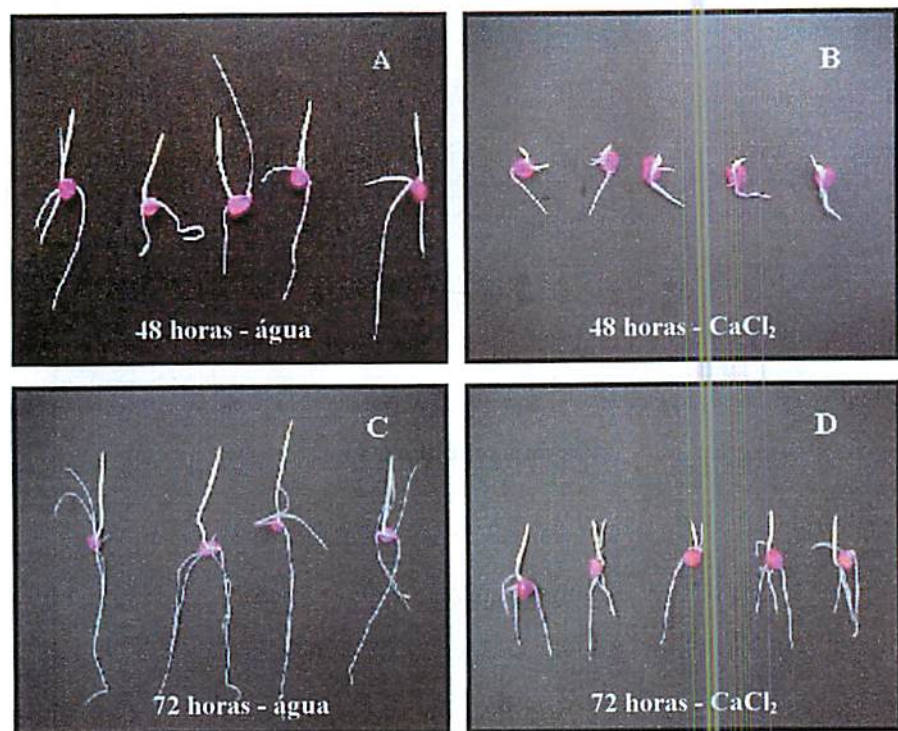


FIGURA 2. Plântulas de milho da variedade BR-154 “Saracura” após embebição em água ou em solução de cloreto de cálcio 0,75 % (p/v). Lavras-MG, agosto de 2001.

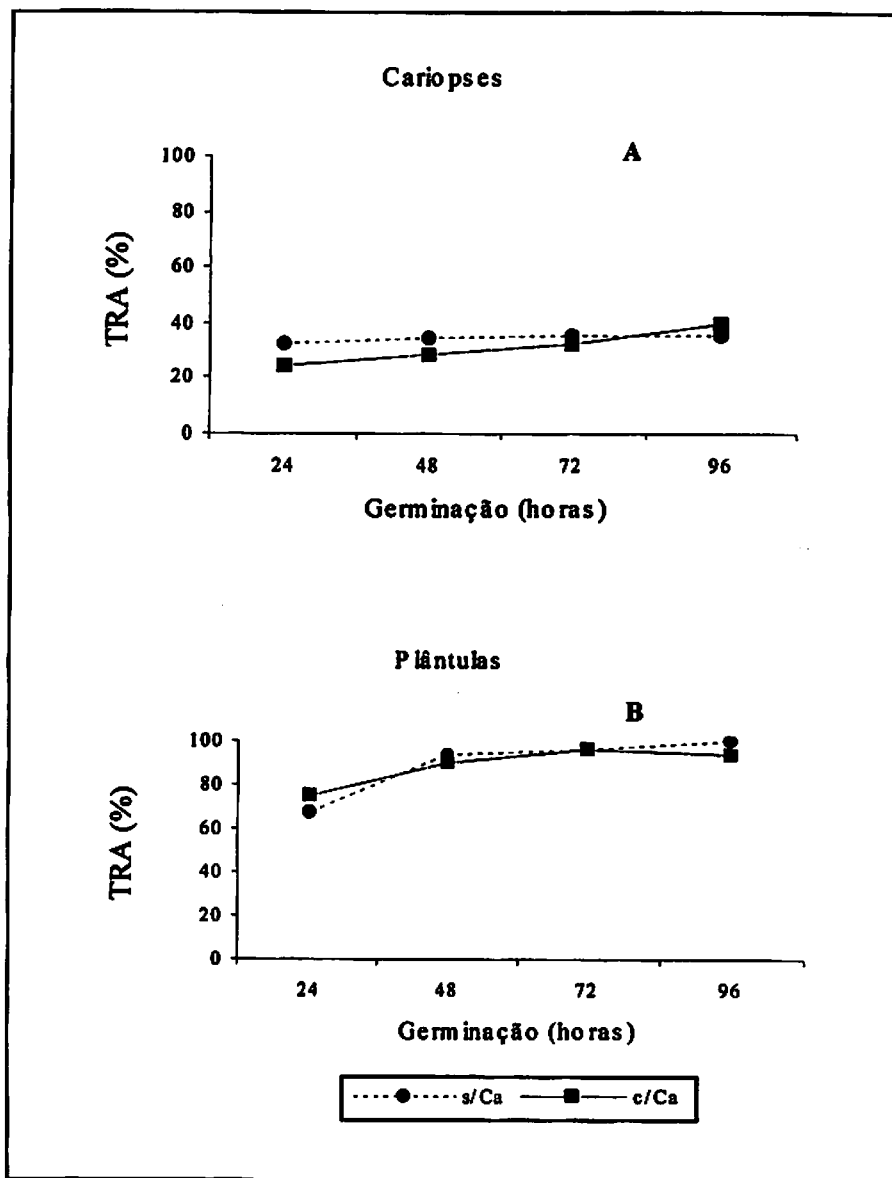


FIGURA 3. Teor relativo de água (CRA) nas cariopses e plântulas, ao longo de 96 horas após início da embebição em água, ou em solução de cloreto de cálcio 0,75 % (p/v). Lavras – MG, agosto de 2001.

Os resultados apresentados na Figura 4 reforçam essa idéia, de forma que nas duas condições estudadas, a presença da cariopse garantiu a manutenção do crescimento da plântula.

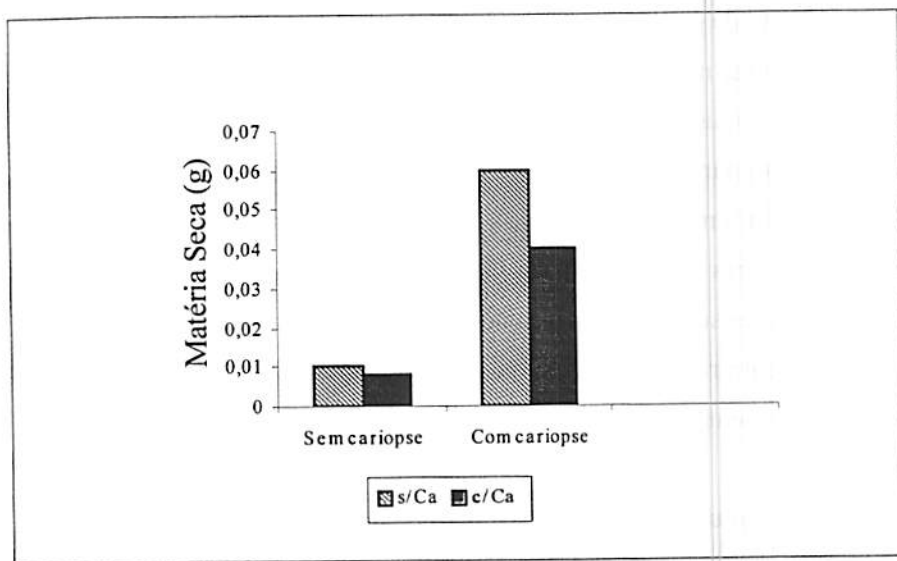


FIGURA 4. Avaliação do efeito da presença da cariopse no desenvolvimento de plântulas germinadas em água e em solução de CaCl_2 . Após 24 horas de embebição, os eixos embrionários foram separados das cariopses e envolvidos novamente em papel 'germitest', onde foram mantidos por um total de 96 horas, em condições de escuro a $26 \pm 2^\circ \text{C}$. s/Ca (sem cálcio); c/Ca (com cálcio). Lavras – MG, agosto de 2001.

Sabe-se que, de maneira geral, durante o processo de germinação, é necessário que ocorra a mobilização das reservas do endosperma, para a retomada do crescimento do eixo embrionário. Analisando-se o conteúdo de açúcares solúveis totais, em diferentes pontos, ao longo da fase de germinação, observa-se nas 24 horas iniciais, um maior conteúdo dessas substâncias nas plântulas providas de germinação em solução de cloreto de cálcio (Figura 5A). A partir de 48 horas, nota-se uma inversão nesse padrão, onde o conteúdo de açúcares solúveis totais foi, de forma significativa, sempre superior naquelas plântulas que germinaram em água. Por outro lado, nas cariopses o conteúdo dessas substâncias foi maior nas plântulas germinadas na ausência do sal apenas nas primeiras 24 horas (Figura 5B). Verifica-se também, que nessas cariopses o conteúdo de açúcares solúveis totais, somente aumentou a partir das 72 horas de germinação, ao contrário daqueles em que a cariopse germinou em contato com o sal, as quais apresentaram um aumento quase que linear, ao longo do período estudado.

A análise conjunta das Figuras 5A e 5B dá uma idéia da mobilização das reservas da cariopse para a plântula, ao longo do período estudado. Verifica-se, então, que as plântulas que germinaram em água apresentaram um aumento no conteúdo dos açúcares solúveis totais, a partir de 48 horas, ao passo que nas cariopses, o conteúdo desses carboidratos sofreu redução nas primeiras 72 horas. Pode-se, dessa forma, inferir que durante esse período, os produtos resultantes da hidrólise do amido foram totalmente translocados para a plântula, portanto, não se acumulando na cariopse. Por outro lado, o aumento quase que linear no conteúdo dessas substâncias, ao longo de todo o período de germinação nas cariopses submetidas a solução de cloreto de cálcio, pode ser atribuído a menor taxa de mobilização das reservas para a plântula em desenvolvimento.

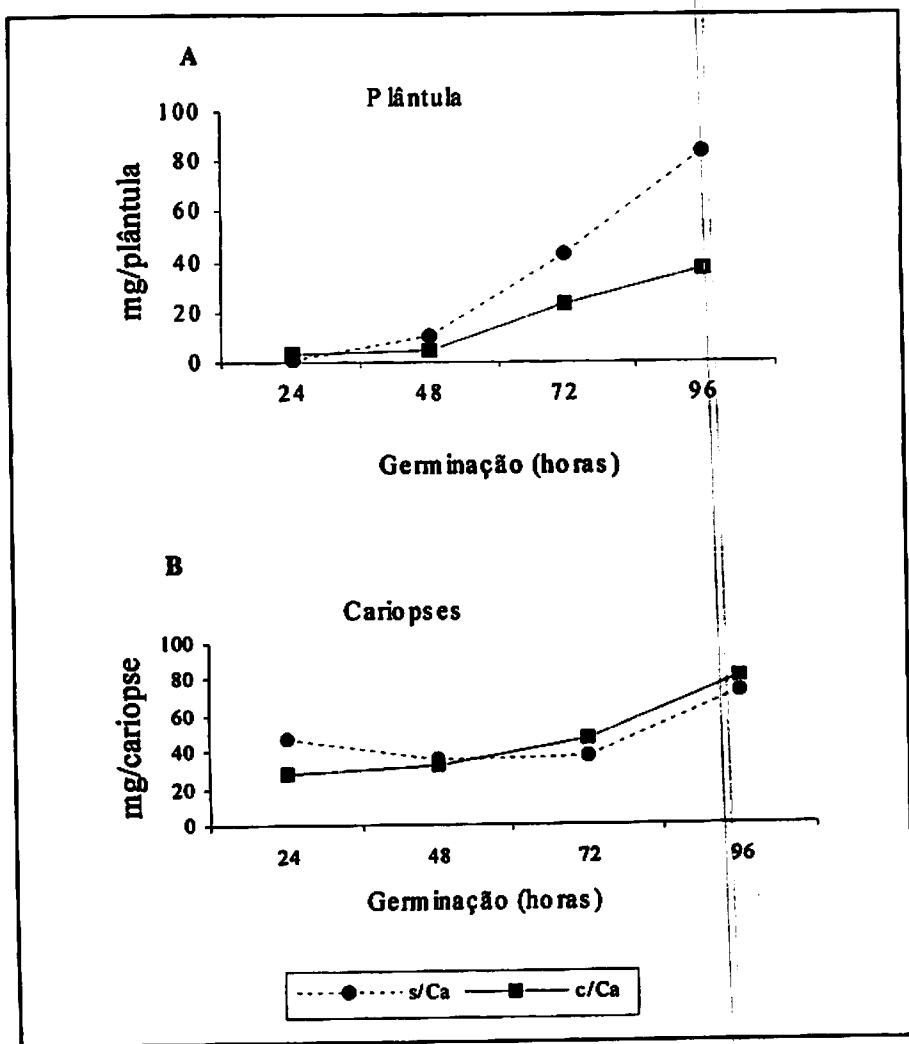


FIGURA 5. Conteúdo de açúcares solúveis totais em plântulas e cariopses, ao longo de 96 horas após início da embebição em água, ou em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). Lavras – MG, agosto de 2001.

As observações a respeito da hidrólise do amido podem ser constatadas mediante o estudo do padrão eletroforético da α -amilase nas cariopses (Figura 6), onde se verifica um aumento na atividade dessa enzima após 24 horas de germinação. A partir deste período, a atividade da α -amilase praticamente dobrou a cada 24 horas, o que pode explicar o acentuado aumento no conteúdo de açúcares solúveis totais nas cariopses ao final da avaliação (Figura 5B).

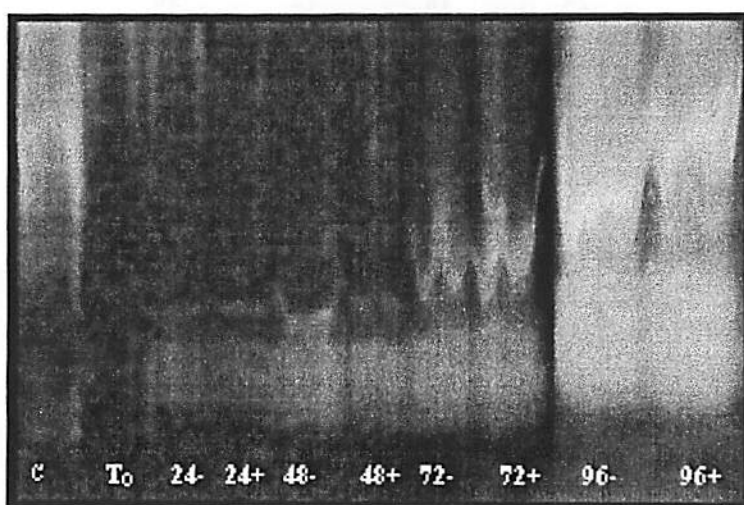


FIGURA 6. Padrão eletroforético da enzima α -amilase em cariopses ao longo de 96 horas após o início da embebição em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). C (controle); T₀ (cariopse antes da embebição); - (embebição em água); + (embebição em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v)). Lavras - MG, agosto de 2001.

A adição de solutos à solução de germinação promove a redução no potencial hídrico do meio, influenciando a capacidade dos tecidos em absorver água. Para uma manutenção adequada da hidratação, plantas nessa condição desenvolvem, entre outros, o mecanismo de ajustamento osmótico, caracterizado pelo aumento na concentração de substâncias osmoticamente ativas nas células (Taiz e Zeiger, 1998). Para verificar essa possibilidade, foram analisados, nas plântulas e nas cariopses, os teores de aminoácidos totais e, em particular, a prolina, que juntamente com os açúcares solúveis totais, formam os principais solutos orgânicos osmoticamente ativos (Mcneil et al., 1999). Nas cariopses, foi observada diferença significativa, na concentração de aminoácidos totais a favor daquelas que foram submetidas ao tratamento com cálcio apenas na última avaliação (Figura 7A). Já nas plântulas, esse tratamento promoveu um acentuado acúmulo de aminoácidos totais (Figura 7B) e prolina (Figura 8) em todas as avaliações.

Esses resultados sugerem que as plântulas germinadas, em contato com o cloreto de cálcio sofreram um ajustamento osmótico, ao elevar a concentração de solutos osmoticamente ativos, seja pela degradação de proteínas (Figura 9), ou pela importação diretamente da cariopse, garantindo assim, um padrão de absorção de água semelhante àquele das plântulas que se desenvolveram na ausência do sal (Figura 3B).

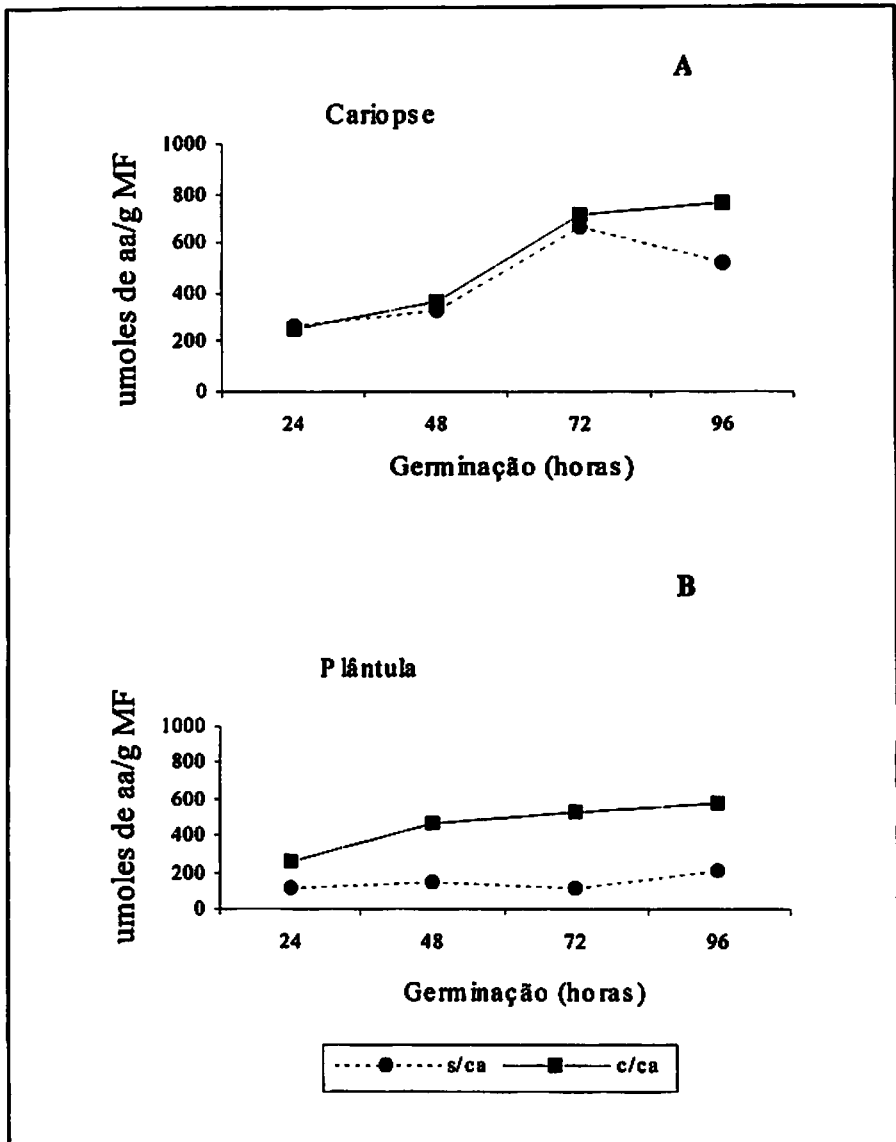
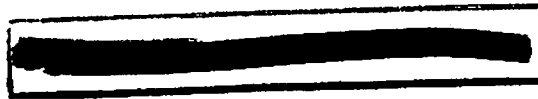


FIGURA 7. Concentração de aminoácidos em cariopses e plântulas ao longo de 96 horas, após início da embebição em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). s/Ca (sem cálcio); c/Ca (com cálcio) Lavras – MG, agosto de 2001.

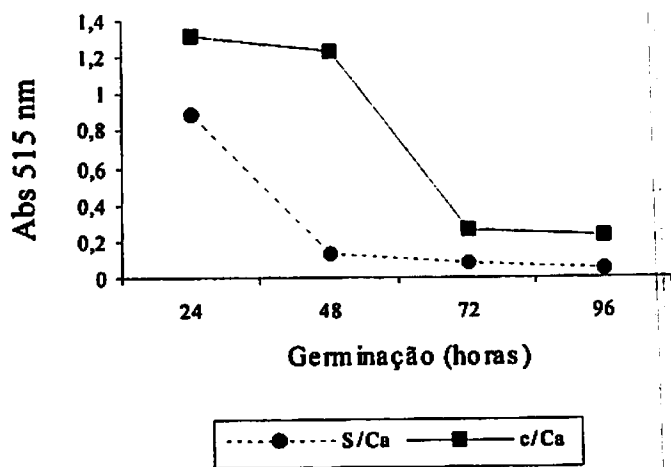


FIGURA 8. Concentração de prolina ao longo de 96 horas, após o início da embebição em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). Lavras – MG, agosto de 2001.

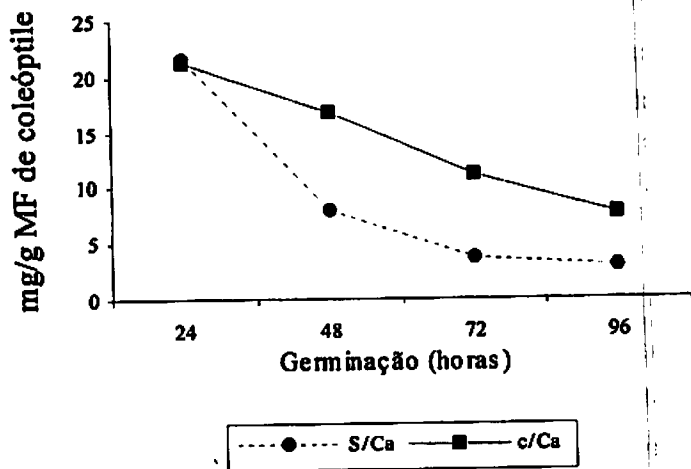


FIGURA 9. Conteúdo de proteínas ao longo de 96 horas, após início da embebição em água e em solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v). Lavras – MG, agosto de 2001.

Não existem, na literatura, trabalhos que suportam essas colocações, pois a maioria dos trabalhos, envolvendo a adição de cloreto de cálcio à solução de germinação, são voltados para avaliação do efeito do cálcio na seletividade de membrana. Nestes casos, sabe-se apenas que o cálcio reverte o efeito tóxico de sais de sódio (Ashraf e Wahid, 2000) e metais pesados (Rivetta et al., 1997).

Uma vez evidenciado que o cloreto de cálcio promove alterações bioquímicas e redução no crescimento, durante o desenvolvimento inicial das plântulas, o próximo passo foi determinar a fase, ao longo da pós-germinação, em que esses eventos acontecem. Ao analisar a matéria seca das plântulas, quando estas foram expostas ao cloreto de cálcio, em diferentes períodos (Figura 10), verificou-se que os maiores valores foram apresentados pelas plântulas que não mantiveram contato com o sal (4-) e nos tratamentos, onde as plântulas permaneceram em contato com o cloreto de cálcio, nas 24 horas (1+3-) e 48 horas (2+2-) iniciais de germinação. Por outro lado, as plântulas que permaneceram todo o tempo de germinação em contato com o sal (4+) ou que o contato tenha acontecido nas 72 horas (1-3+) ou 48 horas (2-2+) finais, tiveram a matéria seca reduzida em torno de 40%. Assim, pode-se concluir que a maior redução no crescimento ocorreu, quando as plântulas ficaram em contato direto com a solução de cloreto de cálcio, nas 48 horas finais de germinação, o que pode ser confirmado, quando se determina a diferença entre os valores de matéria seca das plântulas, que permaneceram as 48 horas finais em água (2+2-) e às que permaneceram em contato com o cloreto de cálcio neste mesmo período (2-2+). O maior acúmulo de matéria seca no primeiro grupo de plântulas pode ser atribuído a uma recuperação no crescimento, pela liberação do efeito do cálcio nas últimas 48 horas de germinação.

Como determinado por Vitorino (1999), a germinação das cariopses em solução de cloreto de cálcio proporciona aumento na sobrevivência das plântulas de milho ao alagamento, nas variedades BR-154 "Saracura" e BR-107,

consideradas como tolerante e sensível a esta condição, respectivamente. Os resultados encontrados por essa autora foram reafirmados pelos trabalhos de Dantas (1999) e Gouvêa (2001), que atribuíram o aumento na sobrevivência ao papel do cálcio como elemento estrutural ao conferir maior resistência às paredes celulares e, com isso, reduzindo o aparecimento de sintomas característicos de plântulas em anoxia, como a presença de constrictões na região do mesocótilo, em função do aumento na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da parede celular nessas condições.

Ao analisar a sobrevivência de plântulas após três dias de alagamento (Figura 11) depois de serem submetidas, na germinação e na fase de pós-germinação, a diferentes períodos de exposição ao cloreto de cálcio, verificou-se que as maiores sobrevivências se deram nos tratamentos 4+, 1-3+ e 2-2+, os quais proporcionaram os valores mais reduzidos de matéria seca (Figura 10).

De acordo com esses resultados, pode-se atribuir ao cálcio um efeito indireto no aumento da sobrevivência, ao estabelecer-se uma relação positiva entre a influência do cloreto de cálcio na redução do crescimento das plântulas e o aumento observado na sobrevivência das mesmas quando submetidas ao alagamento. Verifica-se, portanto, que a ausência do cálcio nas 48 horas finais do período pós-germinativo sempre leva a um aumento significativo na matéria seca e, com isto, a redução da tolerância das plântulas ao estresse.

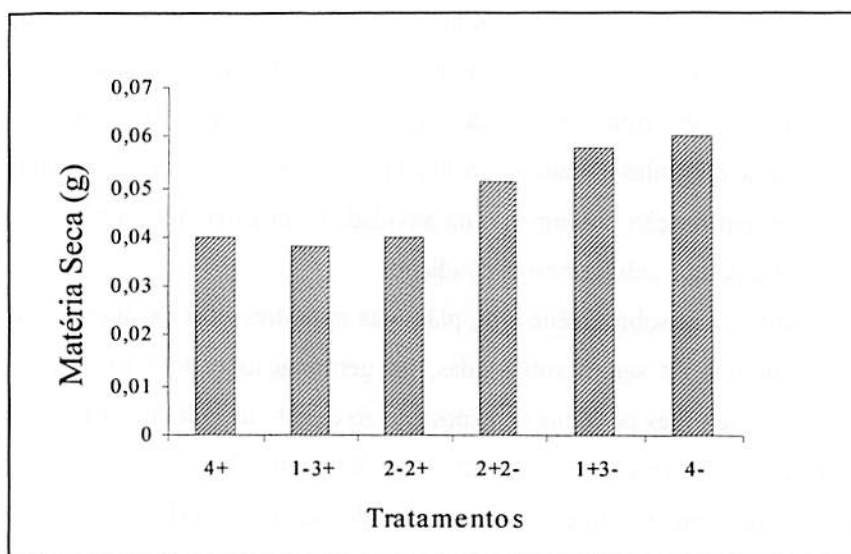


FIGURA 10. Matéria seca de plântulas submetidas à solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v), em diferentes períodos ao longo de 96 horas após início da embebição. 4+ (96 horas em solução de CaCl_2); 1-3+ (24 horas iniciais em água, 72 horas finais em solução de CaCl_2); 2-2+ (48 horas iniciais em água, 48 horas finais em solução de CaCl_2); 2+2- (48 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 48 horas finais em água); 1+3- (24 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 72 horas finais em água); 4- (96 horas em água). Lavras – MG, agosto de 2001.

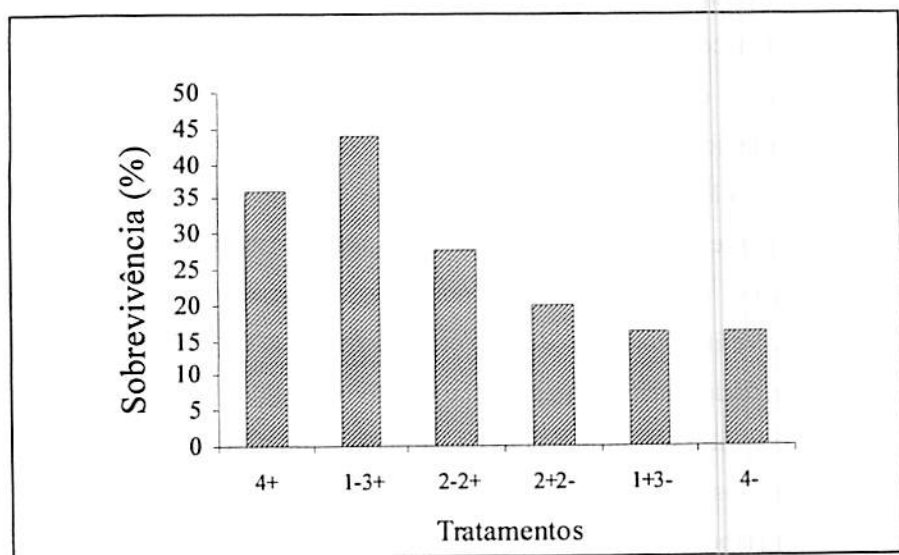


FIGURA 11. Sobrevivência de plântulas ao alagamento, quando submetidas à solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v), em diferentes períodos ao longo de 96 horas após início da embebição. 4+ (96 horas em solução de CaCl_2); 1-3+ (24 horas iniciais em água, 72 horas finais em solução de CaCl_2); 2-2+ (48 horas iniciais em água, 48 horas finais em solução de CaCl_2); 2+2- (48 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 48 horas finais em água); 1+3- (24 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 72 horas finais em água); 4- (96 horas em água). Após 96 horas de embebição as plântulas foram submetidas a 72 horas de hipoxia. Lavras – MG, agosto de 2001.

A partir da análise da distribuição dos açúcares solúveis totais entre as cariopses e as plântulas em desenvolvimento (Figura 12), observa-se que, aquelas que permaneceram em contato com a solução de cloreto de cálcio por mais de 24 horas, o que é o caso dos tratamentos 4+, 1-3+, 2-2+ e 2+2-, apresentaram um maior conteúdo de açúcares solúveis totais na cariopse. Já, quando as plântulas não foram submetidas a solução de cloreto de cálcio (4-) ou quando esse contato se deu apenas nas primeiras 24 horas de germinação (1+3-), houve uma maior alocação desses compostos para as plântulas em desenvolvimento. Verificou-se então, que o contato crescente das plântulas com a solução de cloreto de cálcio, reduzindo seu desenvolvimento (Figura 10), fez com que as reservas ficassem preservadas na cariopse e, quando em condição de alagamento, essas fossem alocadas e utilizadas pelas plântulas permitindo a manutenção do metabolismo por mais tempo nessas condições (Figura 12). Essa idéia pode ser reforçada quando se estudou a influência da cariopse na sobrevivência das plântulas submetidas ao estresse de oxigênio (Figura 13). Constatou-se que, tanto aquelas que não mantiveram contato com o cloreto de cálcio na fase de germinação e pós-germinação como as que foram submetidas ao tratamento, apresentaram maior sobrevivência quando permaneceram ligadas as cariopses durante o alagamento (Figura 13).

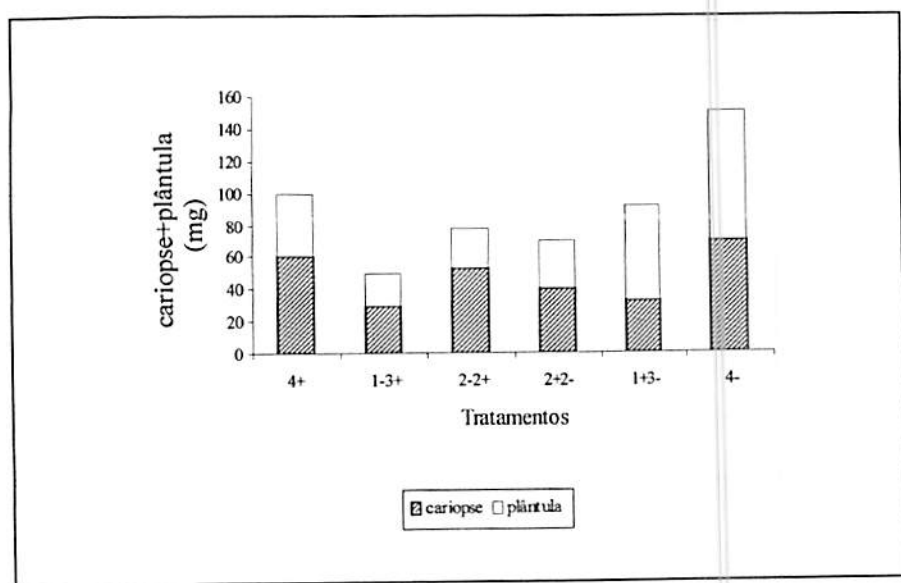


FIGURA 12. Conteúdo de açúcares solúveis totais de cariopse e plântulas submetidas à solução de cloreto de cálcio 0,75% (p/v), em diferentes períodos ao longo de 96 horas após o início da embebição. 4+ (96 horas em solução de CaCl_2); 1-3+ (24 horas iniciais em água, 72 horas finais em solução de CaCl_2); 2-2+ (48 horas iniciais em água, 48 horas finais em solução de CaCl_2); 2+2- (48 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 48 horas finais em água); 1+3- (24 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 72 horas finais em água); 4- (96 horas em água). Lavras – MG, agosto de 2001.

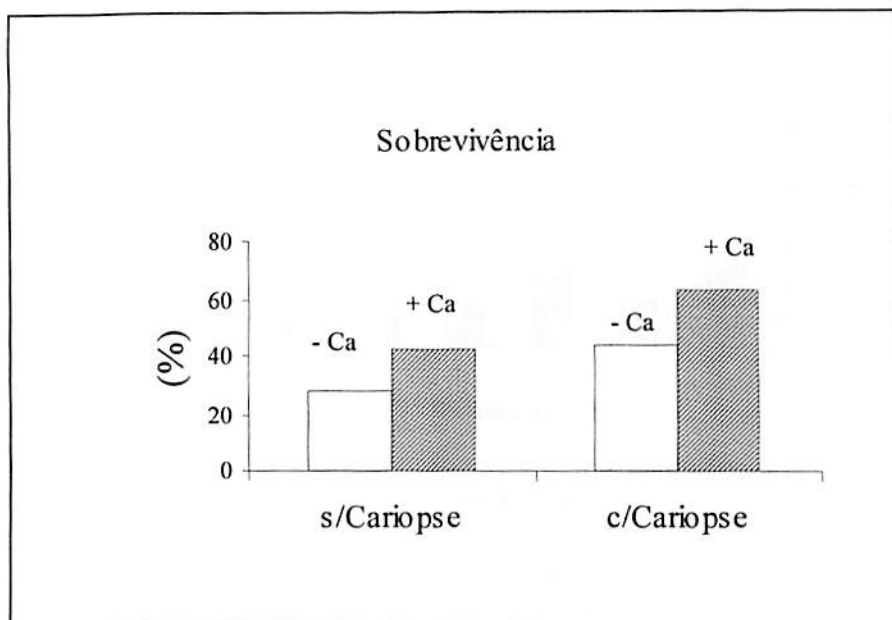


FIGURA 13. Influência da cariopse na sobrevivência de plântulas de milho da variedade BR-154 “Saracura”, em alagamento. Após 96 horas do início da embebição em água e em solução de CaCl_2 as plântulas foram separadas das cariopses e submetidas a 72 horas de alagamento.- Ca (embebição em água); + Ca (embebição em solução de CaCl_2). Lavras – MG, agosto de 2001.

Esta hipótese pode ser confirmada ao se observar que as cariopses que mantiveram o maior contato com o cálcio durante o período de germinação e pós-germinação (tratamentos 4+, 1-3+, 2-2+, 2+2-) apresentaram, após o período de alagamento, menores reduções na atividade da enzima α -amilase (Figura 14).

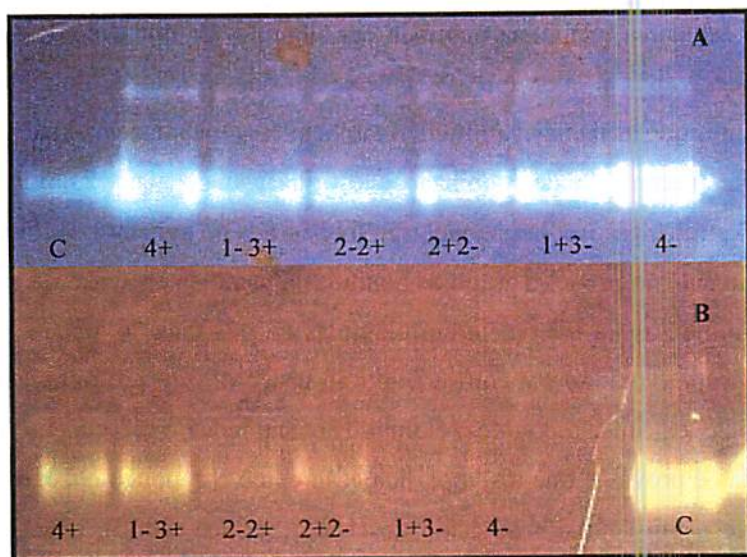


FIGURA 14. Padrão eletroforético da enzima α -amilase em cariopses: A) Após 96 horas de germinação; B) Após 72 horas em condições de alagamento. 4+ (96 horas em solução de CaCl_2); 1-3+ (24 horas iniciais em água, 72 horas finais em solução de CaCl_2); 2-2+ (48 horas iniciais em água, 48 horas finais em solução de CaCl_2); 2+2- (48 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 48 horas finais em água); 1+3- (24 horas iniciais em solução de CaCl_2 , 72 horas finais em água); 4- (96 horas em água). Lavras – MG, agosto de 2001.

Desse modo, conclui-se que, a presença do cálcio induz uma maior tolerância das plântulas ao alagamento por manter ativo o metabolismo de carboidratos, aqui caracterizado pela degradação do amido. Estes resultados confirmam os estudos de Guglielminetti et al. (1995), os quais determinaram que o metabolismo de carboidratos sob anoxia inicia-se com a indução da α -amilase, acumulando glucose, seguida pela síntese da sacarose mediada pela sintase da sacarose, enzima chave na manutenção do metabolismo dos açúcares sob anoxia (Guglielminetti et al., 1997; Zeng et al., 1998; Subbaiah e Sachs, 2001).

Ao estudar a tolerância à anoxia em plântulas de milho de dois a sete dias de idade, VanToai et al. (1995) constataram que aquelas de dois dias são mais tolerantes que as demais, atribuindo também essa tolerância à existência de um eficiente mecanismo de mobilização e utilização de açúcares durante o período de estresse gasoso. Essa conclusão foi baseada no aumento da tolerância a anoxia somente no primeiro grupo de plântulas quando da presença de glucose exógena. Aumentos na tolerância em plântulas de três dias de idade somente foram verificados quando aplicou-se ácido abscísico ou um pré-tratamento de hipoxia. Uma vez constatado que o cloreto de cálcio reduz o crescimento inicial das plântulas é provável que a sua participação como componente osmótico da solução leve a um acúmulo de ácido abscísico (Spollen, 2000), beneficiando assim a tolerância ao estresse anóxico (VanToai et al, 1995).

Pelo exposto, pode-se destacar mais uma vez, que a maior sobrevivência das plântulas de milho da variedade BR-154 “Saracura” submetidas a germinação na presença de solução de cloreto de cálcio, está relacionada a uma menor exportação de açúcares solúveis totais nos primeiros dias após a germinação, atrasando, com isso, o desenvolvimento das plântulas. Dessa forma, a exemplo do exposto por VanToai et al. (1995), as plântulas conservam suas características embrionárias e, por conseguinte, maior tolerância ao estresse.

Essa maior tolerância é caracterizada pela exportação de açúcares solúveis totais da cariopse e expressão de genes, cujos produtos, tais como a α -amilase e, possivelmente, a sintase da sacarose, atuam diretamente como mantenedores do metabolismo anaeróbico.

5 CONCLUSÕES

O cálcio induz um ajustamento osmótico, pelo aumento na concentração de aminoácidos, principalmente, prolina e promove redução no desenvolvimento inicial das plântulas.

A redução no desenvolvimento plântulas faz com que as reservas sejam preservadas nas cariopses, e quando em condições de alagamento essas são alocadas e utilizadas permitindo a manutenção do metabolismo, aumentando desta forma a tolerância ao estresse anoxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.D. Potencial alelopático do angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L) Speg.): efeitos sobre a germinação de sementes e ciclo mitótico de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). Lavras:UFLA, 55p. (Dissertação de Mestrado- Genética). 1997.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1981. 242p.
- ALBRECHT, BIEMELT.; BAUMGARTNER, S. Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. *New Phytologist*, v.136, p.137-144, 1997.
- ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M.M; OLIVEIRA, L.E.M.; VITORINO, P.F.P.G. Mecanismo de tolerância de plantas ao alagamento. *Universa*, Brasília, v.8, n.1, mar. 2000.
- ARMSTRONG, W.; BRANDE, R.; JACKSON, M.B. Mechanism of flooding tolerance in plant. *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v.43, n.4, p.307-358, 1994.
- ASHRAF, M.; WAHID, S. Time-course changes in organic metabolites and mineral nutrients in germinating maize seeds under salt (NaCl) stress. *Seed & Sci. & Technology*, v.28, p.641-656, 2000.
- BATES. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, v.39, p.205-207. 1973.
- BENSEN, R.J.; BOYER, J.S. MULLET, J.E. Water deficit-induced changes in abscisic acid, grow, polysomes and translatable RNA in soybean hypocotyls. *Plant Physiology*, Rockville, v.88, n.2, p.289-294, Oct. 1988.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2 ed. New York: Plenum Press, 455p. 1994.
- BOGGESE, S.F.; STEWART, C.R.; ASPINALL, D.; PALEG, P.G. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursors. *Plant Physiology*, Rockville, v.58, p.398-401, 1976.

- BEZERRA, A.M.** Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com diferentes graus de resistência à seca. Lavras: UFLA, 56 p.(Dissertação de Mestrado- Fisiologia Vegetal). 1996.
- BRADFORD, J.M.** A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248, 1976.
- 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 seedling acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectroetry. *Plant Physiology*, Rockville, v.122, p.295-317, Mar. 2000.
- COCKING, E.C.; YEMM, E.W.** Estimation of amino acids by ninhidrin. *The Biochemical Journal*, London, v.58, p.12-13, Jan.1954.
- CONWAY, W.S.C.E.; WATADA, A.E.** Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium cholidre. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.398. p.31-39, 1995.
- DANTAS, B.F.** Efeito do cálcio no desenvolvimento de aerênquimas e na atividade de enzimas de degradação e afrouxamento de parede celular em plântulas de milho (*Zea may* L.) cv. Saracura BRS 4154 submetidas à hipoxia. Lavras: UFLA, 43 p. (Dissertação de Mestrado- Fisiologia Vegetal). 1999.
- DAMARTY, M.; MORVAN, C.; THELLIER, M.** Calcium and cell wall. *Plant Cell Enviroment*, Oxford, v.7, p.441-448, 1984.
- DAVIES, D.D.; GREGOS, S.; KENWORTH, P.** The control of production of lactate and ethanol by higher plants. *Planta*, New York, v.118, p.297-310, 1974.
- DEUBER, R.** Ciências das plantas daninhas: Fundamentos. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 432p.
- DISCHE, Z.** General color reactions. In: WHISTLER, R.L.& WOLFRAM, M.L (ed). *Carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press, p.477-52, 1962.

- 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.
- GANCEDO, C.; SERRADO, R. Energy yielding metabolism in the Yeasts: **Metabolism and physiology of Yeasts**, v.3, edited by A.H. Rose, and J.S. Stuart. Academic Press, London, p.205-259, 1989.
- GOUVÊA, J.A. Crescimento inicial e sobrevivência do milho (*Zea mais* L.), cv. Saracura BR-154, em hipoxia sob diferentes condições de alagamento. Lavras: UFLA, 33p. (Dissertação de Mestrado- Fisiologia Vegetal). 2001.
- GRANT, G.T.; MORRIS, D.A.; REES, P.J.C.; SMITH. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v.32, p.195-198, 1973.
- GUGLIELMINETTI, L.; WU, Y.; BOSCHI E.; YAMAGUCHI, J. Effect of anoxia on sucrose degrading enzymes in cereal seeds. **Journal Plant Physiology**, v.150, p.251-258, 1997.
- GUGLIELMINETTI, L.; PERATA, P.; ALPI, A. Effect of anoxia on carbohydrate in rice seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, p.735-741, 1995.
- HANHIJARVI, A.M.; FAGERSTEDT, K.V. Comparison of the effect of natural and experimental anoxia on carbohydrate and energy metabolism in *Iris pseudacorus* rhizomes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, p.437-444, 1994.
- HEPLER, P.K.; WAYNE, R. O. Calcium and plant development. **Annual review Plant Physiology and Plant molecular Biology**. Palo Alto, v.36, p.397-439, 1985.
- KOLLER, D.; HADAS, A. Water relations in the germinations of seeds. In: LANG, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOD, C.B.; ZIEGLER, H. (eds). **Physiological plant ecology II. Encyclopedia of plant physiology**. Springer-Verlag, Berlin, v.12B, p.401-431, 1982.

- KOSLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. **Effects of flooding on water, carbohydrates and Plant Growth** Ed. T.T. Koslowloski. Orlando, Academic Press, p.165-193, 1984.
- MCNEIL, S.D.; NUCCIO, M.L.; HANSO, A.D. **Betainas and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance.** *Plant Physiology*, Rockville, v.120, n.4, p.945-949, 1999.
- MORAES, M.G.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M.; VITORINO, P.F.P.G.; MAGALHÃES, M.M. **Caracterização do crescimento e da atividade das desidrogenases alcoólica e láctica em seis espécies herbáceas sob condições de hipoxia.** *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.25, n.1, p.86-95, jan, 2001.
- PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; SOUZA, I.R.P.; MEIRELES, W.; CORREA, L.A. **Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54 – Saracura.** In: *I Reunião de Melhoristas de Milho na América Latina, Colômbia.* 1996
- RIVETTA, A.; NEGRINI, N.; COCUCCI, M. **Involvement of Ca²⁺- calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early of radish (*Raphanus Sativus* L.) seed germination.** *Plant, Cell e Enviroment*, Oxford, v.20, p.600-608, 1997.
- SAINT-GES, V.; **Kinetic studies of variation of cytoplasmatic pH, nucleotide triphophates (³¹P- NMR) and lactate during normoxi and anoxic transitions in maize root tips.** *European Journal Biochemistry*, v.200, p.477-482, 1991.
- SAMARAS, Y.; BRESSAN, R.A.; CSONKa, L.N.; GARCIA-RJOS, M.G.; PAINO D'URSO, M.; RHODES, D. **Proline accumulation during drought and salinity.** In: N Smimoff, (ed), *Enviroment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation.* Oxford, BIOS Scientific Publishers, p.161-187, 1995.
- SELLING, S.; WISSEMEIER, A.H.; CAMBIER, P.; CUTSEM, P.V. **Calcium deficiency in potato (*Solanum Tuberosum* ssp. Tuberosum) leaves and its effects on the pectic composition of the apoplasic fluid.** *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.109, p.44-50, 2000.
- SHARP, R.E.; WU, Y.; VOETBERG, G.S.; SAAB, I.N.; LeNOBLE, M.E. **Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary**

- root at low water potentials. **Journal Experimental Botany**, Firenze, v.45, p.1743-1751. 1994
- SHARP, R.E.; SILK W.K.; HSIAO, T.C. Growth of maize primary root at low water potentials. I. Spatial distribution of expansive growth. **Plant Physiology**, Rockville, v.87, p.50-57, 1988.
- SIDDIQUI, S.; BANGERTH, F. The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. **Journal of Horticultural science**, Kent, v.71, n.5, p.703-708, Sept.1996.
- SMALLWOOD, M.F.; CALVERT, C.M.; BOWLES, D.J. (eds). **Plant responses to environmental stress**. Oxford: BIOS Scientific Publishers. 1999. 224p.
- SPOLEN, G.W.; LeNOBLE, E.M.; SAMUELS, D.T.; BERNSTEIN, N.; SHARP, E.R. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p.967-976, Mar. 2000.
- SUMMERS, J.E.; RATCLIFFE, G.R.; JACKSON, J.B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Patamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.349, p.1413-1422, Agos. 2000.
- SUBBIAIAH, C.C.; SACHS, M.M. Altered Patterns of sucrose syntase phosphorylation and localization precede callose induction and root tip death in anoxic maize seedling. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p.585-594, Feb. 2001.
- SUBBIAIAH, C.C.; BUSH, D.S.; SACHS, M.M. Elevation of cytosolic calcium precede anoxic genes expression in maize suspension cultured cell. **The Plant cell**, Rockville, v.6, n.12, p.1747-1762, Dec.1994.
- SUBBIAIAH, 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, May.1994.
- TAIZ, L. ZEIGER, E. **Plant Physiology**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City. 565p. 1998.

- VANTOAI, T.T.; SAGLIO, P.; RICARD, B.; PRADET, A. Developmental regulation of anoxia stress tolerance in maize. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.18, p. 937-942, 1995.
- VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v.79, p. 3-20, 1997. Supplement A.
- VERLUES, P.E.; SHARP, R.E. Proline accumulation in Maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic Source of increased proline deposition in the elongation zone. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p. 1349-1360, Apr. 1999.
- VITORINO, P.F.P.G. **Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações de parede celular**. Lavras: UFLA, 49p. (Dissertação de Mestrado- Fisiologia Vegetal). 1999.
- YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, Washington, v.217, p.1214-1222, 1982.
- ZENG, Y.; WU, Y.; AVIGNE, W.T.; KOCH, K.E. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and poatranscriptional responses. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.1573-1583, 1998.