

## MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DA VARIEDADE DE MILHO “SARACURA” (BRS 4154) AO ALAGAMENTO

JOSÉ DONIZETI ALVES<sup>1,2</sup>, MARCELO MURAD MAGALHÃES<sup>1,3</sup>, PATRÍCIA DE FÁTIMA PEREIRA GOULART<sup>1,4</sup>, BÁRBARA FRANÇA DANTAS<sup>1</sup>, JORGE ALBERTO DE GOUVÊA<sup>1</sup>, RÚBIA PADILHA PURCINO<sup>1</sup>, PAULO CÉSAR MAGALHÃES<sup>5</sup>, DANIELA DEITOS FRIES<sup>1,6</sup>, DÁRLAN EINSTEIN DO LIVRAMENTO<sup>1,3</sup>, LAUDIENE EVANGELISTA MEYER<sup>1,7</sup>, MARINA SEIFFERT<sup>1,6</sup>, THIAGO SILVEIRA<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Biologia/Setor de Fisiologia Vegetal – UFLA, Caixa postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

<sup>2</sup>Bolsista do CNPq. E-mail: jdalves@ufla.br (autor para correspondência).

<sup>3</sup>Bolsista do CBP & D – Café – UFLA, Caixa postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

<sup>4</sup>Pós-graduanda em Ciência dos Alimentos – UFLA, Caixa postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa – Embrapa Milho e Sorgo, Caixa postal 151, CEP.35701-970 Sete Lagoas, MG

<sup>6</sup>Pós-graduanda em Fisiologia Vegetal – UFLA, Caixa postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

<sup>7</sup>Graduando(a) em Agronomia. – UFLA, Caixa postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

---

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.1, n.1, p.41-52,2002*

**RESUMO** - Esta revisão tem por objetivo discutir mecanismos de tolerância desenvolvidos por plântulas da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154), que possui, como principal característica, tolerância a períodos intermitentes de encharcamento do solo. Os primeiros estudos de análise de tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio no meio, sob condições controladas, em sala de crescimento, confirmaram essa característica, ao revelar que as plântulas suportam até quatro dias de hipoxia sem nenhum dano aparente. A partir daí, apresentaram, na região do mesocótilo, uma região translúcida, característica de lise celular, a qual evoluiu para uma constrição, com o prolongamento do estresse, causando murcha, tombamento e morte das plântulas. Estudos posteriores revelaram que a deficiência de oxigênio provocou uma intensa e irreversível degradação da parede, como resultado de uma elevação na ação, principalmente, das enzimas poligalacturonase e celulase. As causas da tolerância do milho “Saracura” foram atribuídas a uma resistência ao ataque de enzimas de degradação da parede celular, ao desenvolvimento de aerênquimas tanto no colmo quanto nas raízes e a uma alta capacidade de recuperação da fotossíntese após períodos de alagamento. Foi observado que, na germinação, o cálcio diminuiu o tamanho das plântulas e aumentou a sua tolerância ao alagamento, retardando o aparecimento da constrição no mesocótilo. Durante a germinação, na presença desse elemento, as reservas de carboidratos ficaram preservadas na cariopse, atrasando o desenvolvimento das plântulas e, quando em condição de alagamento, essas foram alocadas e utilizadas, permitindo a manutenção do metabolismo celular por mais tempo. Ficou constatado, também, que o cálcio aumentou a estabilidade da parede celular e induziu um ajustamento osmótico, pelo aumento na concentração de aminoácidos, principalmente a prolina.

**Palavras-chave:** hipoxia, cálcio, parede celular, enzimas.

## TOLERANCE MECHANISMS OF “SARACURA” (BRS 4154) MAIZE VARIETY TO FLOODING

**ABSTRACT** - This review aims at discussing the tolerance mechanisms developed by “Saracura” (BRS 4154) maize variety, that has, as a main characteristic, the tolerance to intermitent soil waterlogging. The first studies related to tolerance under low oxygen levels in the environment were performed in controlled conditions in growth chambers, and confirmed this characteristic when seedlings tolerated up to four days of hypoxia without any apparent damage. At this time, seedlings showed in the mesocotyl region, a translucent area, characteristic of stress development, causing wilting, falling off and death. The next studies showed that oxygen deficiency caused an intense and irreversible cell wall degradation as a result of an increase in polygalacturonase and cellulase activities. The causes of maize Saracura tolerance were attributed to a resistance to cell wall enzymes, aerenchyma development in shoot and root and the high photosynthetic recovery capacity after flooding periods. When calcium was added during germination, it was noted a decrease in seedlings size and an increase in flooding tolerance, delaying the appearance of constriction in mesocotyl. During germination carbohydrates reserves were kept in cariopsis, on presence of calcium delaying the seedling development, and when in flooding conditions these compounds were allocated and used, prolongating the celular metabolism. It was also verified that calcium increased the cell wall stability and induced osmotic adjustment by increasing aminoacids concentrarion, mainly proline.

**Key words:** hipoxia, calcium, cell wall, enzymes.

Solos com altos níveis de compactação, drenagem deficiente e sujeitos a alto regime pluvial ou a sistemas de irrigação inadequados apresentam problemas de aeração, que resultam em condições de hipoxia (baixa pressão de oxigênio) ou anoxia (ausência de oxigênio) no ambiente radicular. Plantas que se desenvolvem nessas condições têm os crescimentos vegetativo e reprodutivo reduzidos, de forma que a permanência prolongada sob deficiência de oxigênio pode levá-las à morte. Ao longo da evolução, algumas espécies têm desenvolvido mecanismos de adaptação que as tornam tolerantes, permitindo a sobrevivência em ambientes de baixa pressão de oxigênio, por períodos não muito prolongados.

Nessa condição, o metabolismo celular é desviado para a via anaeróbica, a qual apresenta inconvenientes, como o menor rendimento de energia e a geração de produtos finais considerados tóxicos para a célula, como, por exemplo, etanol e

acetaldeído. A ligeira acidificação do citoplasma, em decorrência da presença do lactato e elevada extrusão de  $H^+$ , devido ao funcionamento precário das ATPases-transportadoras do tonoplasto, também tem sido apontada como causa determinante da morte celular sob anoxia. Mais recentemente, especula-se sobre o envolvimento de polipeptídeos anaeróbicos, que não estão diretamente envolvidos com a preservação do nível energético na célula, como determinadas enzimas de degradação de parede celular.

Entre as plantas cultivadas, o milho é classificado como uma das mais sensíveis à condição de anoxia, de forma que, em áreas sujeitas ao alagamento, o cultivo desse cereal é restringido. Preocupados com esse problema e explorando as conhecidas variações de tolerância às condições de inundação por espécies vegetais, a Embrapa Milho e Sorgo, após nove ciclos de seleção, lançou no mercado, em 1997, a variedade de milho BRS 4154,

também conhecida como “Saracura”, que possui como principal característica a tolerância a períodos intermitentes de inundação do solo.

A partir de então, o setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (FV-UFLA), em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo, vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de caracterizar os mecanismos envolvidos com a tolerância ao déficit de oxigênio por essa variedade. Os resultados verificados até o momento mostraram que, em relação à variedade BR 107, a variedade “Saracura” (BRS 4154) apresentou-se altamente tolerante, quando submetida a condições experimentais de hipoxia, comprovando o desempenho no campo, durante o processo de seu melhoramento genético.

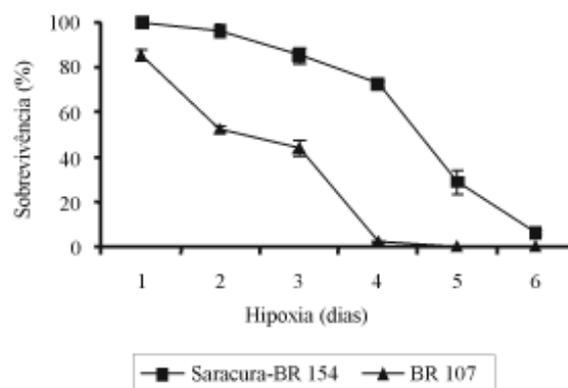
Nesta revisão, discutem-se alguns mecanismos de tolerância desenvolvidos por plântulas dessa variedade, quando submetida ao déficit de oxigênio imposto por condições de alagamento.

#### Caracterização da tolerância do milho “Saracura” ao alagamento

A variedade “Saracura” foi desenvolvida como uma opção para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento temporário. Esse composto de milho de ampla base genética obteve, sob condições de deficiência de oxigênio no meio, aumentos em alguns parâmetros relacionados com a produção, os quais permitiram a sua seleção (Parentonni et al., 1996).

Os primeiros estudos de análise da tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio no meio, sob condições controladas em sala-de-crescimento, mostraram que o “Saracura” apresentou índices percentuais de sobrevivência superiores ao BR 107, para um, dois e três dias de hipoxia, respectivamente (Figura 1) (Vitorino, 1999; Vitorino et al., 2001). Após o quarto dia, as plantas do BR 107 mostraram sua sensibilidade à deficiência de oxigênio no meio, apresentando taxa de sobrevivência próxima

de zero. Naquele mesmo período, a sobrevivência do “Saracura” foi de 73%. Desta forma, observa-se que, em relação à variedade BR 107, a variedade “Saracura” (BRS 4154) apresenta-se com alta tolerância à hipoxia.

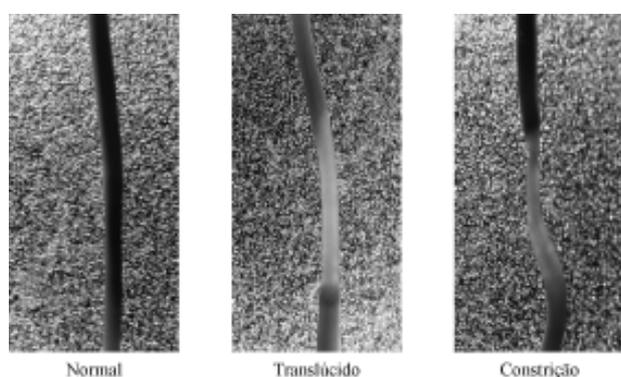


**FIGURA 1.** Sobrevivência de plântulas de milho das variedades BR 107 e “Saracura” submetidas a condições de deficiência de oxigênio. Barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4. (Vitorino et al., 2001).

Trabalhando com diversos híbridos, sob condições de estresse anaeróbico, Lemke-Keyes & Sachs (1989) verificaram que o milho B73Ht apresentou melhor desempenho, chegando a índices de sobrevivência de 61% e 14%, após três e quatro dias de estresse anaeróbico, respectivamente. Para o mesmo período, sob deficiência de oxigênio no meio, o “Saracura” apresentou índices de sobrevivência de 85% e 73% e, mesmo após cinco dias de anoxia, ainda manteve índice de sobrevivência de 29% (Figura 1), valor superior a mais que duas vezes o índice obtido pelo milho norte-americano.

Somente a partir do quarto dia de deficiência de oxigênio, as plântulas do “Saracura” sofreram queda acentuada na sobrevivência, tornando-se flácidas, com reflexos negativos na sua recuperação pós-hipoxia. Plântulas que não conseguiram sobreviver pós-hipoxia apresentaram, na região do mesocótilo, durante o estresse, uma região

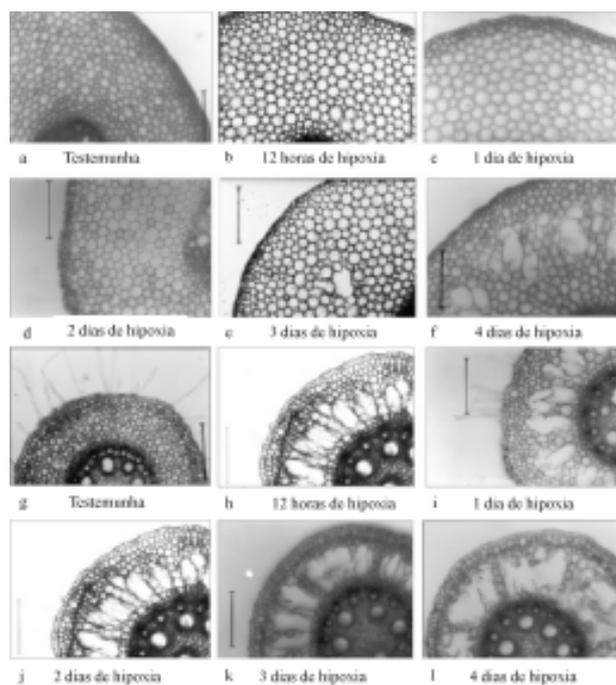
translúcida (Figura 2). Com o prolongamento do déficit de oxigênio, as plântulas se tornaram flácidas, formando-se, naquela região, uma forte constrição, responsável pelo tombamento e morte. No milho BR 107, esse fenômeno aconteceu mais precocemente, quando comparado com o “Saracura”, sugerindo, assim, que a formação da região translúcida e o desenvolvimento de zonas amolecidas no mesocótilo podem servir como parâmetro de avaliação dos primeiros sinais indicativos da irreversibilidade dos danos causados pelo déficit de oxigênio em plântulas de milho.



**FIGURA 2.** Segmentos do mesocótilo com aparência e consistência distintas (normal, translúcido e constrição), de plântulas do milho “Saracura” submetidas a condições de deficiência de oxigênio. (Vitorino et al., 2001).

Apesar da intensidade do estresse, existem várias espécies de plantas, especialmente aquelas mais adaptadas a ambientes encharcados, que respondem favoravelmente a uma baixa oxigenação do solo com a formação de aerênquima (Menezes Neto et al., 1995a e b; Moraes et al., 2001; Kawase, 1979; Justin & Armstrong, 1987; Drew, 1997), uma especialização do tecido parenquimático onde se desenvolvem grandes espaços intercelulares, formando uma fase gasosa contínua que se estende por todo o tecido (Mauseth, 1988). Para o milho “Saracura”, foi verificado um aumento progressivo do aparecimento dessa estrutura tanto na parte aérea (Figura

3a-f) quanto nas raízes (Figura 3g-l), em resposta a períodos crescentes de hipoxia (Dantas et al., 2001). Considerando que a presença de aerênquimas confere às plantas maior adaptação à baixa disponibilidade de oxigênio (Drew, 1997), o milho “Saracura” reagiu eficientemente a esse estresse, podendo valer-se desse recurso para manter-se vivo por mais tempo.



**FIGURA 3.** Desenvolvimento de aerênquimas nas regiões apical de coleóptiles (a, b, c, d, e, f) e intermediárias de raízes (g, h, i, j, k, l) de plântulas de milho BRS 4154 “Saracura” submetidas a diferentes períodos de hipoxia. As barras nas fotomicrografias equivalem a 3,5  $\mu$ m. (Dantas et al., 2001).

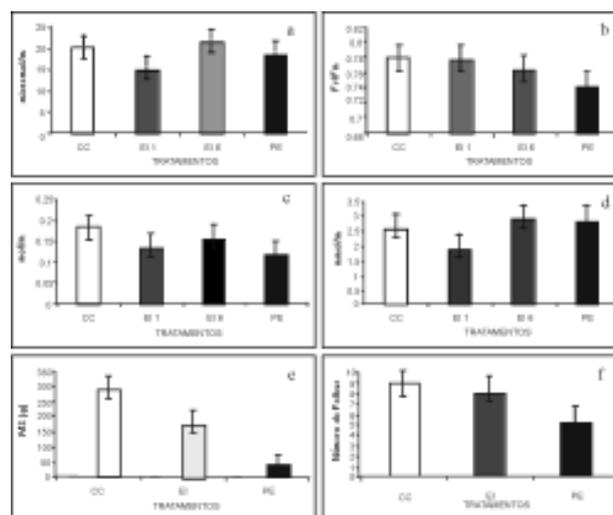
A formação de aerênquimas é vantajosa em plantas que se desenvolvem em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio, por diminuir a resistência de difusão desse gás entre órgãos aerados e não aerados (Drew, 1997). Dessa forma, ainda que o ambiente externo esteja hipóxico, ou mesmo anóxico, internamente a raiz encontra-se aerada. Quando aerênquimas não se desenvolvem, o déficit de oxigênio no interior da raiz permite a produção

de ATP apenas pela rota fermentativa, que tem eficiência 18 vezes menor na produção de energia que o ciclo do ácido tricarbóxico (Taiz & Zeiger, 1998). A pequena quantidade de energia produzida nessa condição torna-se insuficiente para o desenvolvimento da planta e induz precocemente sua senescência (Yen & Yang, 1998). No caso do milho “Saracura”, a hipoxia induziu a formação de grandes espaços intercelulares, formando aerênquimas do tipo lisígeno, devido a aumentos nas atividades das enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular, como, por exemplo, celulase, poligalacturonase e xiloglucano *Endo*-transglicosilase (Dantas et al., 2001). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Magalhães et al. (2001), que observaram aumentos na porosidade de raízes do milho “Saracura” nos tratamentos com maior frequência de encharcamento, em condições de casa-de-vegetação.

Existem, na literatura, diversos trabalhos mostrando que o alagamento promove decréscimo na capacidade fotossintética das plantas, por afetar importantes processos associados com absorção e assimilação do CO<sub>2</sub>. Livramento et al. (2001), ao submeterem plantas do milho “Saracura”, com trinta dias de idade, a diferentes regimes de água no solo, observaram uma queda na fotossíntese um dia após o encharcamento (Figura 4a - EI 1). Com a suspensão da adição de água e seis dias após a drenagem do solo (EI 6), essa característica voltou ao nível de controle (CC). A recuperação da fotossíntese em períodos que sucederam ao estresse também foi observada durante um período mais prolongado de encharcamento (PE), quando constatou-se a manutenção da fotossíntese no mesmo nível das plantas que estavam sendo cultivadas na capacidade de campo.

Ao estudar o efeito do estresse de oxigênio sobre a fotossíntese, tomando como base a relação Fv/Fm (Figura 4b), Livramento et al. (2001) verificaram que o encharcamento do solo diminuiu esse parâmetro para 0,74, o que não chega a indicar danos ao fotossistema II das plantas permanentemente

encharcadas. Para os demais tratamentos, Fv/Fm permaneceu ao nível do controle. No caso da condutância estomática, verificou-se diferença significativa apenas quando as plantas foram submetidas ao encharcamento prolongado (Figura 4c). Uma vez que a fotossíntese das plantas em solo permanentemente encharcado não sofreu decréscimo em relação ao controle, excluiu-se a possibilidade de uma regulação direta da condutância sobre a mesma, levando a sugerir que o decréscimo da fotossíntese um dia após o encharcamento pode ser atribuído a uma inibição temporária da capacidade carboxilativa no tecido, como sugerido por Vú & Yelenosky (1991) para diversas culturas. A variação observada na condutância estomática também não foi suficiente para causar diferenças significativas na transpiração de plantas submetidas ao encharcamento e controle (Figura 4d).



**FIGURA 4.** Fotossíntese (a), fluorescência (b), condutância estomática (c), transpiração (d), matéria seca (e) e emissão foliar (f) de plantas de milho da variedade BRS-4154 “Saracura” submetidas a diferentes regimes de encharcamento do solo. Legenda: CC = capacidade de campo; EI 1 = encharcado intermitente (alagado a cada sete dias, com drenagem livre), um dia após a aplicação do tratamento; EI 6 = encharcado intermitente, seis dias após a drenagem; PE = permanentemente encharcado (Livramento et al., 2001).

Quando ao acúmulo de matéria seca (Figura 4e) e emissão de folhas (Figura 4f), foram verificados decréscimos proporcionais à intensidade do estresse. Esses resultados comprovam, então, a tolerância da variedade do milho “Saracura” ao encharcamento intermitente do solo (EI), quando se observa um pequeno decréscimo no desenvolvimento das plantas sob essa condição de estresse.

### **Causas da perda da tolerância à hipoxia das plântulas do milho “Saracura” sob condições alagadas**

Deficiência de oxigênio no solo causada pelo excesso de água altera a expressão de genes, levando, em alguns casos, a um ajustamento metabólico, anatômico ou morfológico, que permite às plantas sobreviverem por períodos mais prolongados nessa condição desfavorável (Alves et al., 2000). Em raízes primárias de plântulas de milho, nas duas primeiras horas de estresse anaeróbico, ocorre forte repressão da síntese de proteínas aeróbicas, acompanhada de progressiva indução da síntese de 20 polipeptídeos anaeróbicos (Sachs et al., 1980). A maioria desses polipeptídeos tem sido identificada como sendo enzimas envolvidas na glicólise ou no metabolismo dos açúcares-fosfato, e enzimas envolvidas com o processo de afrouxamento de parede celular, como a xyloglucano *Endo*-transglicosidase, celulase e poligalacturonase (Peschke & Sachs, 1994; He et al., 1996; Dantas et al., 2001).

O milho “Saracura” tolera longos períodos sob fortes condições de hipoxia, sem grandes prejuízos para a sua sobrevivência. No entanto, sua permanência sob baixas pressões de oxigênio promove o aparecimento de regiões amolecidas no mesocótilo, as quais são provocadas por uma elevação na atividade das enzimas poligalacturonase e celulase, atuando na própria parede celular ou na lamela média. Concluiu-se, assim, que o déficit de oxigênio, em plântulas de milho, provoca “desarranjos” dos componentes da parede celular, de forma que

as células sem a devida coesão e com paredes celulares desorganizadas entram em colapso ao perderem sua integridade (Dantas, 1999; Dantas et al., 2001). Vitorino et al. (2001) comprovaram, mediante dados obtidos por cromatografias gélica e gasosa e análise de FTIR (Espectro de Infravermelho com Transformação dos Dados pela Série de Fourier) de segmentos do mesocótilo, que a evolução do déficit de oxigênio provocou degradação da parede celular, ao revelar um predomínio de polímeros com peso molecular menor, na região afetada pelo estresse.

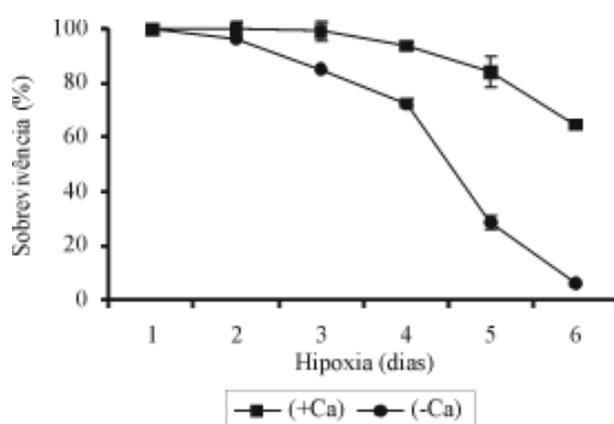
### **Efeito do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho submetidas à deficiência de oxigênio no meio**

Diversos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de estender o período máximo de alagamento de uma cultura ao estresse anóxico ou hipóxico. Pré-tratamento de hipoxia antes do período de anoxia (Drew, 1997; Johnson, et al., 1994), aplicações exógenas de hormônios (Ellis et al., 1999), açúcares (Perata et al., 1997) e cálcio (Subbaiah et al., 1994a) são os tratamentos mais comumente encontrados na literatura.

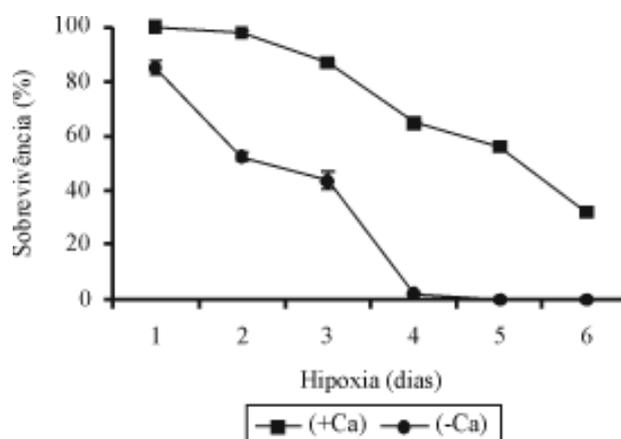
Subbaiah et al. (1994b), estudando o envolvimento do cálcio intracelular mediante o uso de antagonistas do cálcio ou de bloqueadores de canais de cálcio, concluíram que esse elemento exerce importante papel na sobrevivência de plântulas de milho em ambiente anaeróbico. O cálcio estaria atuando como elemento importante na transdução de estímulos externos (deficiência de oxigênio) em respostas metabólicas (Aurisano et al., 1995; Felle & Hepler, 1997; Sheen, 1996; Subbaiah et al., 1994a e b). Os dois últimos trabalhos demonstram que, sob anoxia, a mobilização do cálcio de reservatórios intracelulares até o citoplasma induziu a transcrição dos mRNAs *adh1* e *sh1*, que, uma vez traduzidos, levaram à síntese das proteínas anaeróbicas desidrogenase alcoólica e sintase da

sacarose, respectivamente, tornando as plântulas mais tolerantes ao estresse gasoso.

Vitorino (1999), ao estudar o envolvimento do cálcio na tolerância das plântulas de milho ao estresse de oxigênio, observou que o cloreto de cálcio a 0,51%, quando adicionado no papel de germinação e, posteriormente, no tampão de alagamento, foi eficiente em aumentar a sobrevivência das plântulas. Ao mesmo tempo, mostrou que a sobrevivência das plântulas na presença do cálcio aumentou consideravelmente, tanto para o “Saracura” (Figura 5a) quanto para o BR107 (Figura 5b), retardando, assim, a morte das mesmas. Na ausência do cálcio, o milho “Saracura” suportou até dois dias de hipoxia, sem prejuízo na taxa de sobrevivência; na presença do elemento, essa sobrevivência foi prolongada para quatro dias (Figura 5a). Por outro lado, para o BR 107, considerado como sensível, o cálcio foi capaz de elevar a sobrevivência acima daquela observada para o “Saracura”, quando submetido à hipoxia na ausência do cálcio por mais de quatro dias. Esse aumento na sobrevivência foi atribuído à presença do cálcio atuando como elemento estrutural, conferindo maior resistência à parede celular.



**FIGURA 5A.** Sobrevivência de plântulas de milho da variedade BRS 4154 “Saracura”, na presença e ausência de cálcio, em função do tempo de deficiência de oxigênio. As barras indicam a média + ou - erro padrão da média n = 4. (Vitorino, 1999).

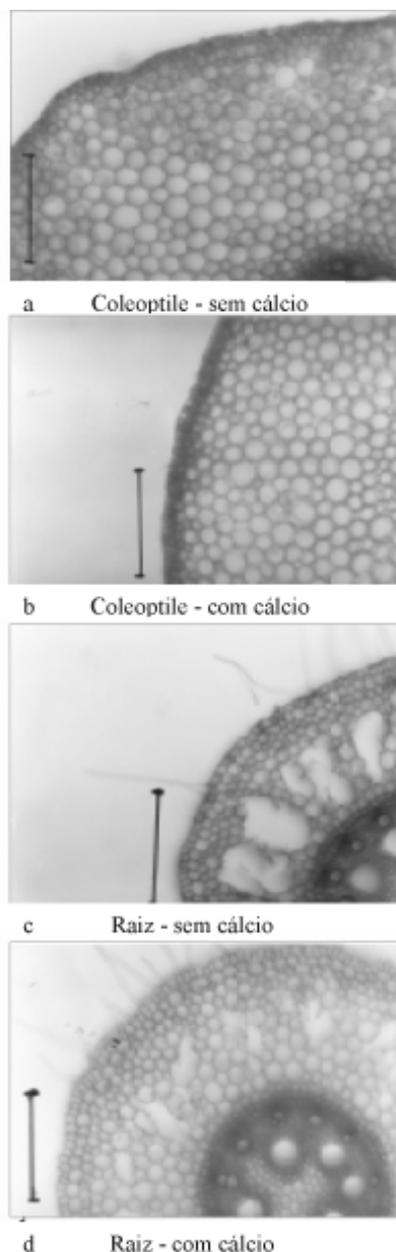


**FIGURA 5B.** Sobrevivência de plântulas de milho da variedade BR 107, na presença e ausência de cálcio, em função do tempo de deficiência de oxigênio. As barras indicam a média + ou - erro padrão da média n = 4. (Vitorino, 1999).

Uma vez que a hipoxia estimulou a formação de aerênquimas lisígenos na parte aérea e raízes, Dantas et al. (2001) aplicaram cálcio no papel de germinação e no tampão de alagamento, a fim de estudar o seu efeito no desenvolvimento dessas estruturas. Verificaram, então, que o cálcio reduziu consideravelmente a presença de espaços intercelulares na parte aérea e raiz das plântulas submetidas a hipoxia (Figura 6).

O cálcio, aplicado na concentração de 0,51%, promove ligações covalentes entre grupos carboxílicos de ácidos poligalacturônicos de pectinas (Jarvis, 1984), o que, segundo Conway et al. (1995), torna a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis por sua degradação. Baseados nas informações de Vitorino et al. (2001), de que a hipoxia provoca “desarranjos” dos componentes da parede celular, e em estudos de atividades da celulase, Dantas et al. (2001) concluíram que o cálcio age como um elemento importante na manutenção da integridade dessa estrutura durante o período de hipoxia, evitando, dessa forma, o colapso celular. Sendo assim, o cálcio aumenta a tolerância de plântulas de milho ao alagamento, atuando na estabilidade da

parede celular, através da ação inibitória na atividade de enzimas hidrolíticas e na redução de seu acesso aos sítios de hidrólise.

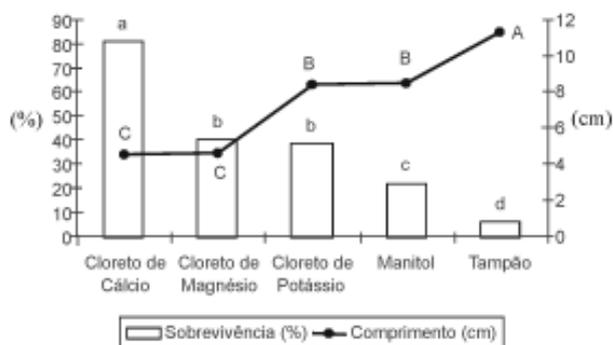


**FIGURA 6.** Efeito do cálcio no desenvolvimento de aerênquimas em plântulas de milho “Saracura” submetidas a um dia de hipoxia. As barras nas fotomicrografias equivalem a 3,5  $\mu\text{m}$ . (Dantas et al., 2001).

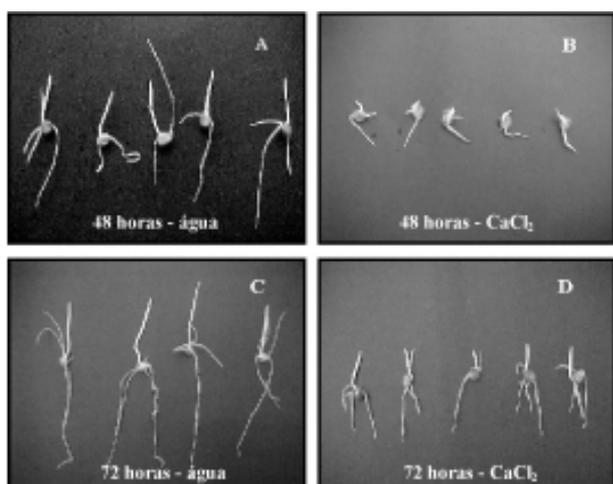
Como foi discutido anteriormente, aerênquimas são considerados estruturas de adaptação de plantas a ambientes alagados. No entanto, a degradação da parede celular imposta por períodos prolongados de hipoxia provoca uma lise excessiva de células na região apical de coleóptiles, que, em estágio mais avançado, forma uma constrição e, conseqüentemente, a morte das plântulas. A aplicação de cálcio exógeno retardou o aparecimento de danos na parte aérea e, com isto, garantiu maior percentagem de sobrevivência de plântulas, ainda que as raízes apresentassem menor volume de aerênquimas (Vitorino, 1999).

#### **Efeito do cálcio na germinação de sementes de milho e seu envolvimento no aumento da tolerância das plântulas ao alagamento**

Dando continuidade aos trabalhos de caracterização da tolerância da variedade “Saracura” ao alagamento, Gouvêa (2001) verificou que a presença de cloreto de cálcio na germinação de cariópses de milho provocou uma redução no crescimento das raízes logo após o período de germinação e aumentou a sua sobrevivência, quando submetidas a hipoxia (Figura 7). A germinação com manitol, quando comparada com a testemunha, comprovou um forte efeito osmótico, atuando na redução do crescimento e no prolongamento da tolerância da variedade “Saracura” (BRS 4154) às condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Dessa forma, além de se reafirmar o papel do cálcio como elemento estrutural, mostrou-se a existência de uma osmorregulação, causada pelo componente osmótico da própria solução de cloreto de cálcio, que, no caso, foi de  $-0,25$  MPa. Purcino (2001) confirmou esses resultados, ao constatar que a presença de cloreto de cálcio na solução de germinação inibiu o desenvolvimento das plântulas, notadamente a da parte aérea (Figura 8).



**FIGURA 7.** Comprimento de raízes seminais após quatro dias de germinação e sobrevivência de plantas de milho “Saracura”, após quatro dias, em diferentes meios de alagamento. Valores das colunas e linhas seguidas da mesma letra minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem significativamente entre si (Scott-Knott 5%). Adaptado de Gouvêa (2001).



**FIGURA 8.** Plântulas do milho “Saracura” após embebição em água ou em solução de cloreto de cálcio 0,75 % (p/v), durante o período de germinação. Purcino (2001).

Purcino (2001) estudou o efeito do cálcio na germinação e no crescimento inicial das plântulas de milho “Saracura”, relacionando esses fatores com o aumento da sobrevivência durante a condição de hipoxia. Na presença de água como solução de embebição do papel de germinação, ocorreu uma

rápida e intensa mobilização das reservas de carboidratos da cariópse para a plântula, suficiente para atender o seu metabolismo e crescimento durante a fase de germinação. Posteriormente, quando essas plântulas foram submetidas à hipoxia, elas se encontravam exauridas das reservas de carboidratos, entravam em colapso e morriam. Por outro lado, quando a água foi substituída pelo cloreto de cálcio na germinação, as reservas ficaram preservadas na cariópse, comprometendo o crescimento das plântulas durante aquele período. Uma vez alagadas, as plântulas passaram a alocar e a utilizar essas reservas para a manutenção do seu metabolismo. Essa idéia foi reforçada com os resultados da influência da cariópse na sobrevivência das plântulas ao alagamento, em que, tanto as não tratadas com cálcio como as que foram submetidas ao tratamento apresentaram maior sobrevivência quando essa permaneceu com a cariópse durante o alagamento.

Ao estudarem 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 a 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 à 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 et al., 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 "Saracura" (BRS 4154), submetidas à 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 Van Toai 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  $\alpha$ -amilase (Purcino, 2001) e, possivelmente, a sintase da sacarose, atuam diretamente como mantenedores do metabolismo anaeróbico.

#### Literatura Citada

- ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M.M.; OLIVEIRA, L.E.M.; VITORINO, P.G. Mecanismo de tolerância de plantas ao alagamento. **Universa**, Brasília, v.8, p.221-242, 2000.
- AURISANO, N.; BERTANI, A.; REGGIANI, R. Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.36, p.1525-1529, 1995.
- CONWAY, W.S.; SAMS C.E.; WATADA, A.E. Relationship total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. **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 mays* L.) cv. Saracura BRS 4154 submetidas à hipoxia**. 1999. 43f. Dissertação (Tese em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- 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, p.251-257, 2001.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p.223-250, 1997.
- ELLIS, M.H.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v.119, p.57-64, 1999.
- FELLE, H.H.; HEPLER, P.K. The cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by  $Ca^{2+}$ -selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. **Plant Physiology**, Bethesda, v.114, p.39-45, 1997.
- GOUVÊA, J.A. **Crescimento inicial e sobrevivência do milho (*Zea mays* L.), cv. Saracura BR-154, em hipoxia sob diferentes condições de alagamento**. 2001. 33 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Transduccion of ethylene signal required for cell death and lysis in teh root cortex of maize during aerenchima formation during hipoxia. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, p. 463-472, 1996.
- JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.7, p.153-164, 1984.
- JOHNSON, J.R.; COBB, B.G. ; DREW, M.C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* null *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Bethesda, v.105, p.61-67, 1994.

- JUSTIN, S.H.F.W.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, Oxford, v.106, p.465-495, 1987.
- KAWASE, M. Role of ethylene on aerenchyma development in sunflower. **American Journal of Botany**, Bronx, v.66, p.183-190, 1979.
- LEMKE-KEYES C. A.; SACHS, M. M. Genetic variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germoplasm. **Maydica**, Bergamo, v.34, p. 329-337, 1989.
- LIVRAMENTO, D.E.; ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M. M.; FREITAS, R. B.; MEYER, L.E.; Avaliação das trocas gasosas, eficiência fotoquímica e desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes regimes de encharcamento do sistema radicular. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Anais ... Ilhéus: SBFV, 2001. CD-ROM.**
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F. O.M.; ANDRADE, C. L. A.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, I.R.P.; GAMA, E.G. Adaptação do milho a diferentes condições de encharcamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Anais ... Ilhéus: SBFV, 2001. CD-ROM.**
- MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1988. 560p.
- MENEZES NETO, M.A.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M. Anaerobic metabolism in *Euterpe oleracea*. I. Alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and seed embryo development. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.7, p.41-45, 1995a.
- MENEZES NETO, M.A.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M. Anaerobic metabolism in *Euterpe oleracea*. II. Plant tolerance mechanism to anoxia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.7, p.47-51, 1995b.
- MORAES, M.G.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M.; VITORINO, 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, p.86-95, 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: REUNION LATINOAMERICANA, 4.; e, REUNION DELA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EN MAIZ, 17., 1997, Cerete Y Cartagena de Ludias, Colombia. **Memória ... S.L.: CORPOICA/ CIMMYT**, s. d. p.368-373.
- PESCHKE, V.M.; SACHS, M.M. Characterization and expression of anaerobically induced maize transcripts. **Plant Physiology**, Bethesda, v.104, p 387-394, 1994.
- PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L. ; ALPI, A. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. **Annals of Botany**, London, v.79, p.49-56, 1997. Supplement A .
- PURCINO, R.P; **Efeito fisiológico do cálcio na germinação e crescimento inicial de plântulas de milho BRS-4154 “Saracura” e sua relação com o aumento da tolerância ao alagamento**. 2001. 40 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic protein of maize. **Cell**, Cambridge, v.20, p.761-767, 1980.

- SHEEN, J.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. **Science**, Washington, v.274, p.1900-1902, 1996.
- 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**, Bethesda, v.122, p.967-976, 2000.
- 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, p.1747-1762, 1994a.
- SUBBAIAH, C.C.; ZHANG, J.; SACHS, M.M. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v.105, p.369-376, 1994b.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood Benjamin/Cummings, 1998. 565p.
- 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.
- VITORINO, P.G. **Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações de parede celular**. 1999. 49 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- VITORINO, P.G.; ALVES, J.D.; MAGALHÃES, P.C.; MAGALHÃES, M.M.; LIMA, L.E.M.O. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hipoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p.1027-1035, 2001.
- VU, J.C.V.; YELENOSKI, G. Photosynthetic responses of citrus tree to soil flooding. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.81, p.7-14, 1991.
- YEN, C.H.; YANG, C.H. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 39, p. 922-927, 1998.