

Atividade Amilolítica de Sementes das Cultivares de Milho Saracura-BRS4154 E CATI AL34 Submetidas ao Alagamento

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

DANTAS, B.F., ARAGÃO, C.A., CATANEO, A.C., CAVARIA NI, C., NAKAGAWA, J., RODRIGUES, J.D.

Embrapa Semi-Árido BR428, km 152, C.P. 23, Petrolina-PE, CEP 56300-970
barbara@cpatsa.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1985), as enzimas de degradação de reservas podem ou não estar presentes nas sementes quiescentes. As enzimas *preexistentes* são detectadas em baixa atividade nessas sementes e, durante a embebição da semente, são ativadas e secretadas para as células onde ocorrerá a degradação das reservas. Por outro lado, ainda durante a embebição, é induzida a síntese *denovo*, a partir dos aminoácidos disponíveis, de enzimas que não são detectadas nas sementes quiescentes (Varner et al., 1965).

O amido é o principal carboidrato de reserva de cereais, (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985), constituindo, aproximadamente, 72% da semente de milho e 88% de seu endosperma (Medcalf, 1973). Devido à sua característica granular e insolúvel, o amido da semente é resistente ao ataque enzimático (Fannon et al., 1992). A sua degradação durante a germinação ocorre por meio de duas vias, a via hidrolítica (amilolítica) e a via fosforolítica (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). A via hidrolítica é predominante em cereais e é iniciada pela ação da α -amilase (EC 3.2.1.1) que quebra, ao acaso, as ligações α -1,4 entre os resíduos de glicose das cadeias de amilose e amilopectina (Dunn, 1974; Sun & Henson, 1990). Entre as enzimas amilolíticas ativas durante a germinação, acredita-se que a α -amilase exerça papel fundamental na degradação de amido em sementes de cereais, devido ao seu poder de iniciar a hidrólise de grãos de amido insolúveis (Dunn, 1974; Beck & Zeigler, 1989) e por apresentar 90% da atividade amilolítica total no início da germinação (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). No entanto, segundo Sun & Henson (1990), só a ação conjunta das diversas hidrolases, como a α -amilase, β -amilase, enzimas desramificadoras e α -glucosidase, resulta na degradação completa do amido. Al-Ani et al. (1985), por sua vez, verificaram que as reservas de amido e a atividade de α -amilase exercem importante papel na manutenção do metabolismo de sementes de milho (*Zea mays* L.) sob deficiência de O₂. No entanto, pouco se conhece sobre a atividade amilolítica de sementes de milho em condições hipóxicas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade amilolítica durante a germinação de sementes de milho cvs. Saracura e AL34, submetidas ao alagamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal/FCA e de Bioquímica de Plantas do

Departamento de Química e Bioquímica/IB da Universidade Estadual Paulista de Botucatu, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2001.

Para avaliação da atividade de α -amilase e de amilases totais, as sementes submetidas aos períodos de submersão conforme descrito por Martin et al. (1991) foram divididas em quatro porções. Uma porção foi prontamente congelada a -20°C , para extração das enzimas e as outras três foram semeadas em gerbox, sobre duas camadas de papel mata-borrão embebidos com 12,5mL de água destilada e mantidas a 27°C e congeladas após durante 2, 4 e 7 dias.

A extração das enzimas amilolíticas, assim como o ensaio de atividade foi realizado conforme método descrito por Gugelmineti et al. (1995). Foram retirados os eixos embrionários (raiz e parte aérea), quando estes existiam, restando apenas o pericarpo, camada de aleurona e endosperma, que foram macerados com almofariz e pistilo em tampão TRIS-HCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$, pH 7, contendo NaCl $0,1\text{mol.L}^{-1}$ e CaCl_2 10mmol.L^{-1} e centrifugadas a 12.000g , 4°C durante 10 minutos, coletando-se o sobrenadante que foi congelado a -20°C até a realização dos ensaios. A atividade de amilases totais e de α -amilase foi medida em um sistema de reação, contendo tampão de reação (Acetato de sódio 50mmol.L^{-1} , pH 5,2 e CaCl_2 10mmol.L^{-1}) e amido solúvel de batata 2,5%, como substrato. Esse sistema de reação foi incubado a 35°C durante 15 minutos. Para inativar outras amilases, permanecendo apenas a α -amilase, o extrato cru foi mantido a 70°C , durante 15 minutos. Ao final do ensaio os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959), e a atividade de amilases totais e α -amilase foi expressa em mmol de açúcares redutores produzidos pela degradação de amido, por mg de proteína, por minuto. A determinação de proteínas totais foi realizada de acordo com o método proposto por Lowry et al. (1951), a partir de curva padrão de BSA (albumina bovina sérica) com leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de resposta da atividade de α -amilase é semelhante ao da atividade de amilases totais em todas as condições testadas. No entanto, devido à inativação de várias enzimas, com banho-maria a 70°C , a atividade de α -amilase foi menor que a atividade de amilases totais em todos os ensaios. Nas duas cultivares estudadas, a atividade de α -amilase e de amilases totais aumentou até o sétimo dia de germinação em condições normais de oxigênio (Figura 1).

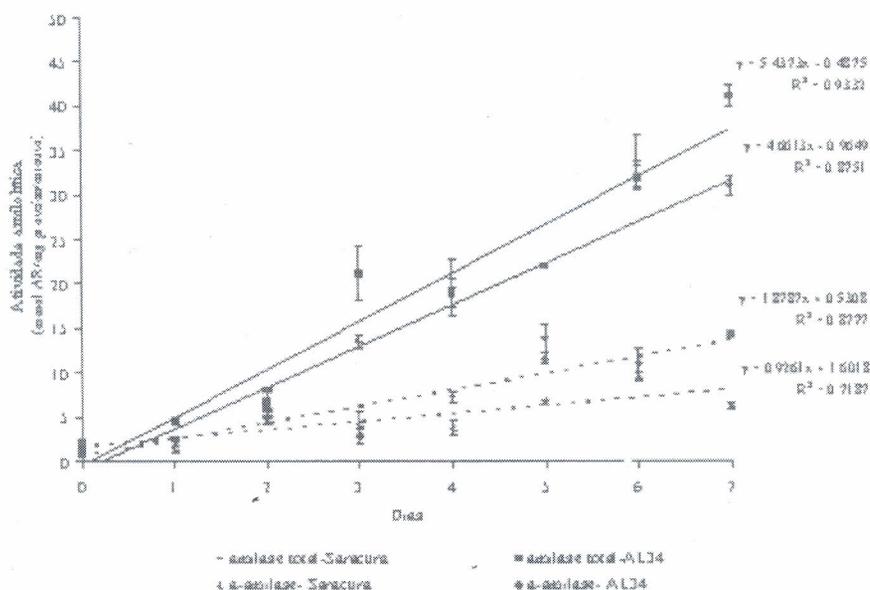


FIG. 1. Resultados médios de (a) germinação e da (b) primeira contagem da germinação de sementes (%) armazenadas de milho super doce, submetidas a doses crescentes de GA.

A atividade das amilases totais, no entanto, têm um ritmo de crescimento mais acelerado que a atividade de α -amilase. Isso ocorre porque as amilases totais, que são a α -amilase, β -amilase, enzimas desramificadoras e α -glucosidase, além de ser sintetizadas, algumas dessas enzimas, por serem *preexistentes*, são ativadas durante a germinação das sementes (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). A indução da síntese de α -amilase e ativação das demais amilases foi verificada após dois dias de germinação em condições normais de oxigênio, atingindo um ápice após quatro dias e decaindo, novamente, aos sete dias de germinação (Figuras 2 e 3). A atividade amilolítica medida no quarto dia de germinação após a submersão, indicou que as sementes da cv. Saracura possuíam atividade de α -amilase e amilases totais crescentes até quatro dias de hipoxia e que a atividades dessas enzimas decresciam logo após o primeiro dia de hipoxia nas sementes da cv.AL34. Segundo vários autores, em sementes de cereais e leguminosas a atividade amilolítica aumenta até, aproximadamente, o décimo dia após o início da embebição, sendo que o maior aumento ocorre por volta do quinto dia.

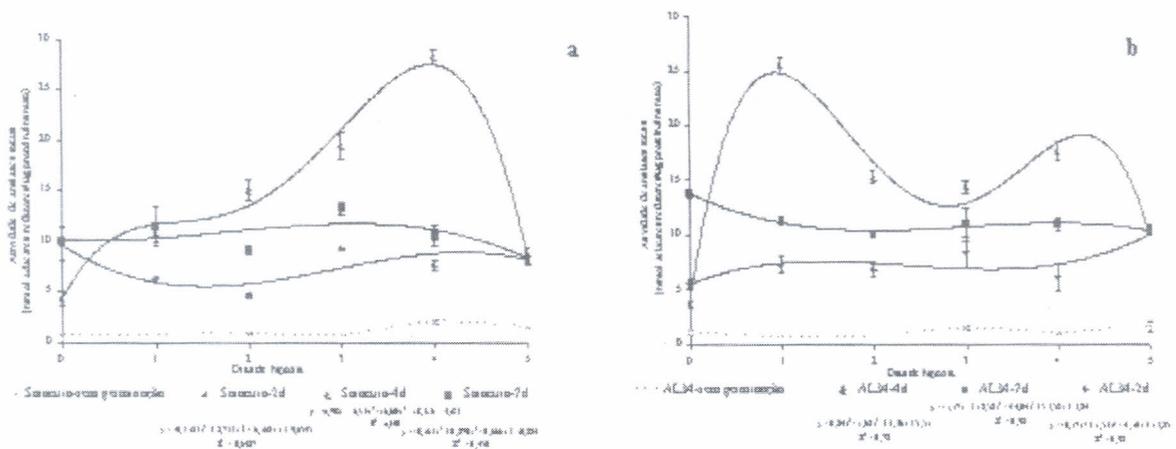


FIG. 2. Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. (a) BRS1454-Saracura e (b) CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia.

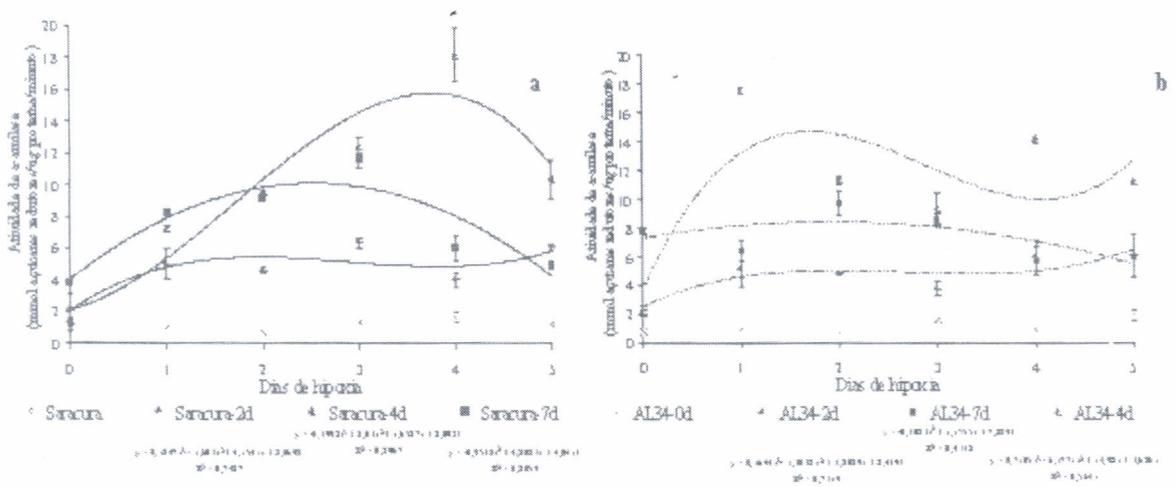


FIG. 3. Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. (a) BRS1454-Saracura e (b) CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia

Pode-se concluir, portanto, que as sementes da cultivar Saracura são mais tolerantes que as da cultivar AL34, e que em ambas as cultivares a deficiência de oxigênio inibe a degradação e mobilização das reservas.

REFERÊNCIAS

AL-ANI, A., BRUZAU, F., RAYMOND, P., SAINT-GES, V., LEBLANC, J. M., PRADET, A. Germination, respiration, adenylete energy charge of seeds at various oxygen pressures. **Plant Physiology**. v. 79, p.885-980, 1985.

BECK, E. & ZEIGLER, P. Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 40, p. 95-117, 1989.

DUNN, G. A model for starch breakdown in higher plants. **Phytochemistry**, v.13, n.2, p.1341-6. 1974.

FANNON J.E.; HAUBER, R.J.; BEMILLER, J.N. Surface pores of starch granules. **Cereal Chemistry**, v.69, p.284-288, 1992.

GUGLIEMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J. PERATA, P. & ALPI, A. Amilolitic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. **Plant Physiology**. v.109, n.1, p.1069-1076. 1995.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**,

- Bethesda. v.193, p.265-275, 1951.
- MARTIN, B.A.; CERWICK, S.F. & REDING, L.D. Physiological basis for inhibition of maize seed germination by flooding. **Crop Science**, Madison, v.31, n.6, p.152-1057, 1991.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of plants**. Oxford: Pergamon Press, 4ed, 1985. 270p.
- MEDCALF, D.G. Structure and composition of cereal component as related to their potential industrial utilization. In: **Industrial uses of cereal**. POMERANS, Y. (ed.). St Paul: American Association of Cereal Chemistry, 1973. p.121-160.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.
- SUN, Z. & HENSON, C.A. Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. **Plant Physiology**, v.94, p.320-327. 1990.
- VARNER, J.E.; RAM-CHANDRA, G. CHRISPEELS, M.J. **Journal of Cell Composition and Physiology**, v.66 (supplement), p.55-60, 1965.