

Atividade amilolítica e germinação de sementes de milho submetidas à deficiência de oxigênio.

Bárbara França DANTAS¹, Carlos Alberto ARAGÃO¹, Ana Catarina CATANEO², Cláudio CAVARIANI¹, João NAKAGAWA¹, João Domingos RODRIGUES³.

¹Departamento de Produção Vegetal, ²Departamento de Química e Bioquímica, ³Departamento de Botânica, UNESP, Botucatu-SP (babitadantas@zipmail.com.br)

Introdução

A ativação dos processos fisiológicos necessários para a germinação requer apropriado suprimento de água, temperatura adequada e presença de O₂ (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1978). A inundação do solo restringe a disponibilidade de O₂ para o embrião, inibindo ou retardando a germinação de sementes de várias espécies (Kozłowski e Pallardy, 1997). Durante grandes períodos de hipoxia, o metabolismo energético das sementes é bastante afetado e a via glicolítica é desviada para a via fermentativa (Bertani et al., 1980). Al-Ani et al. (1985) 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.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos causados pela deficiência de O₂ em sementes de milho na atividade amilolítica e sua influência no vigor das sementes e crescimento das plântulas.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas e no Laboratório de Bioquímica de Plantas do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, nos meses de agosto de 2000 a março de 2001. As sementes de milho das cultivares Saracura e AL34 foram submersas em 50mL de água destilada em copos plásticos de 250mL, contendo cada copo 50 sementes. Para prevenção do crescimento de bactérias e de fungos foram adicionados antibiótico (Ampicilina 100 μ g.L⁻¹) e fungicida (Rhodiauram 750mg.L⁻¹) à solução de alagamento (Martin et al., 1991). As cariopses submetidas à alagamento foram, então, incubadas em germinadores a 27°C, segundo Martin et al. (1991), no escuro, durante 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

Após os períodos em alagamento as sementes foram submetidas ao teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS; Brasil, 1992). As quatro subamostras de 50 sementes de cada tratamento, previamente tratadas com fungicida (Captan 0,2%), foram distribuídas em rolo de papel toalha germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato e mantidas em germinador a 27°C, no escuro. As avaliações foram feitas aos quatro e sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais, conforme indicadas nas RAS (Brasil, 1992). A primeira contagem do teste de germinação, realizada quatro dias após a semeadura, foi considerada como um teste de vigor, sendo determinada a porcentagem de plântulas normais, conforme indicadas nas RAS (Brasil, 1992).

A avaliação do crescimento de plântulas foi feita de acordo com Nakagawa (1999). Foram distribuídas 10 sementes sobre uma linha traçada no terço superior, no sentido longitudinal de papel substrato pré-umedecido. As sementes foram posicionadas com a extremidade da raiz primária para a parte inferior do papel. Foram confeccionados rolos semelhantes ao teste de germinação (Brasil, 1992) e quatro rolos (quatro repetições) foram agrupados, fechados em saco plástico e colocados verticalmente no interior do germinador a 27°C por 4 dias. Após este período mediu-se o comprimento da parte aérea e da raiz primária das plântulas normais.

Para avaliação da atividade de α -amilase e de amilases totais, as sementes submetidas aos períodos de submersão foram divididas em duas porções. Uma porção foi prontamente congelada a -20°C , para extração das enzimas e a outra foi semeada em gerbox, sobre duas camadas de papel mata-borrão e mantidas a 27°C durante 4 dias. Após este período as sementes foram, também, congeladas a -20°C . A extração das enzimas amilolítica, assim como o ensaio de atividade foi realizado conforme método descrito por Gugelmineti et al. (1995). As enzimas amilolíticas foram homogeneizadas 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 10.000g , 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. Para inativar as outras amilases, permanecendo apenas a α -amilase, o extrato cru foi mantido a 70°C , durante 15 minutos. O sistema de reação foi incubado a 35°C durante 15 minutos. Ao final do ensaio os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), 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.

Resultados e Discussão

A germinação e o vigor das sementes da cultivar Saracura diminuíram a partir de 2 dias de hipoxia e da cultivar AL34 diminuíram logo após a submersão (Figura 1a e b). Da mesma forma, o crescimento da parte aérea e da raiz primária das plântulas da cv. Saracura se manteve até o segundo dia de deficiência de O_2 nas sementes. A partir disto, o tamanho das plântulas diminuiu. As sementes de AL34 submetidas à hipoxia produziram plântulas com parte aérea e raiz primária menores que as testemunhas (Figura 2a e b).

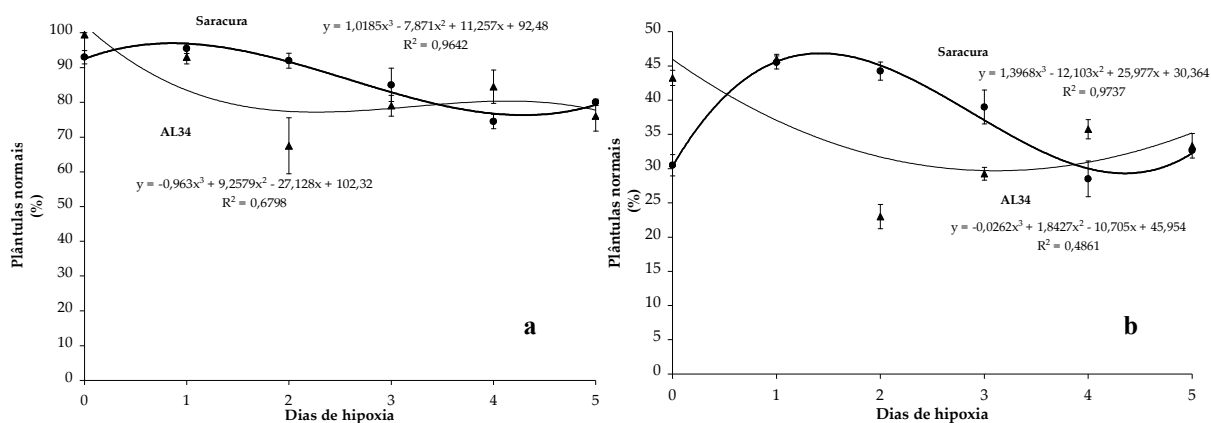


Figura 1. Germinação final (a) e primeira contagem da germinação (b) de sementes de milho das cultivares Saracura e AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia.

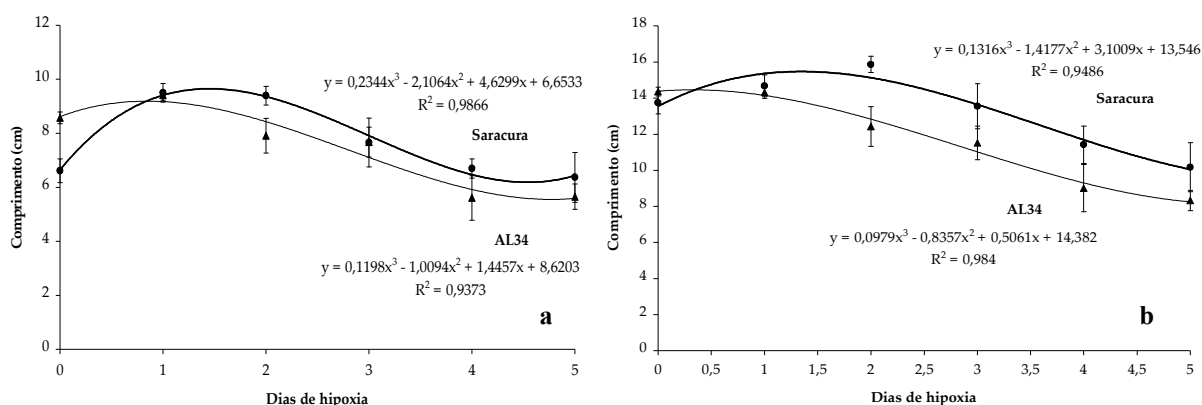


Figura 2. Crescimento de parte aérea (a) e raiz primária (b) de plântulas de milho das cultivares Saracura e AL34, cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.

A atividade de amilases totais e de α -amilase logo após a retirada da submersão foi muito baixa não indicando diferenças entre os tratamentos. No entanto, a atividade amilolítica medida ao 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 (Figura 3 a e b).

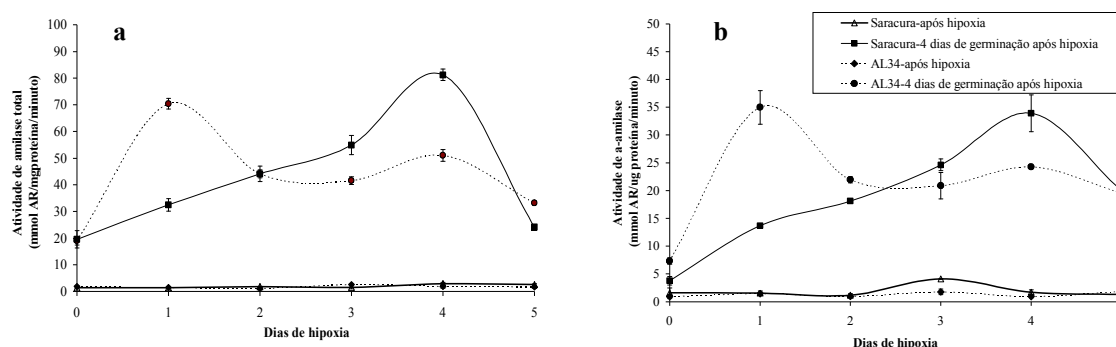


Figura 3. Atividade de amilases totais (a) e de α -amilase (b) de sementes de milho das cultivares Saracura e AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia.

Estes resultados indicam maior tolerância das sementes da cultivar Saracura à hipoxia em relação à cultivar AL34, sugerido pelos dados de qualidade fisiológica da semente (germinação, vigor e crescimento de plântulas). Os dados referentes à atividade amilolítica das sementes, por apresentarem a mesma tendência que os de qualidade fisiológica, indicam que a tolerância está diretamente ligada a uma maior atividade de α -amilase e amilases totais.

Conclusões

Os resultados do trabalho permitem concluir que: (1) A hipoxia causou queda da qualidade fisiológica das sementes de milho das duas cultivares estudadas. (2) As sementes da cv. Saracura apresentaram maior tolerância que aquelas da cv. AL34 às condições de hipoxia às quais foram impostas. (3) A atividade amilolítica foi afetada com a submersão das sementes mas apresentou recuperação após a retirada das sementes dessa condição.

Referências Bibliográficas

- 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.
- BERTANI, A., BRAMBILLA, I., MENEGUS, P. Efect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate, and fate of fermentation products. **Journal of Experimental Botany**. v. 31, p. 325-331, 1980.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.
- GUGELMINETTI, L.; YAMAGUCHI, J. PERATA, P.; ALPI, A. Amilolitic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic conditions. **Plant Physiology**. v.109, p.1069-1076. 1995.
- KOZLOWSKI, T.T. & PALLARDY S.G. **Growth control in woody plants**. American Press: San Diego, 1997. 254p.
- 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**. 4ed. Oxford: Pergamon Press 1978. 270p.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes**. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇANETO, J.B. (eds.). Londrina: ABRATES, 1999. 218p.