

## **Efeitos do cálcio e do encharcamento do solo na proteína e na porosidade de raízes de milho “Saracura”.**

Paulo C. Magalhães<sup>1</sup>, Isabel R. P. de Souza<sup>1</sup>, Frederico O. M. Durães<sup>1</sup>, Décio Karam<sup>1</sup> e Antônio C. de Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pesquisadores Embrapa Milho e Sorgo, Caixa postal 151. 35701-970 Sete Lagoas, M.G. E-mail: pcesar@cnpmc.embrapa.br

Palavras chave: Encharcamento, cálcio, proteína, porosidade de raízes

### **INTRODUÇÃO**

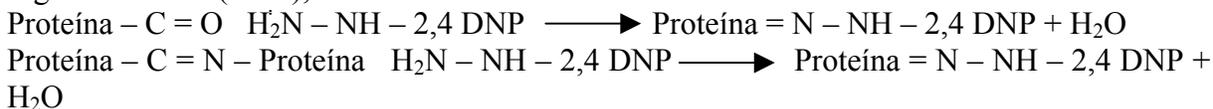
No Brasil, estima-se que haja cerca de 28 milhões de hectares de solos sujeitos a encharcamento temporário e que podem ser incorporados ao processo produtivo. A cultura do milho apresenta-se como uma opção válida, especialmente para as várzeas. Em algumas espécies vegetais são conhecidas as variações de tolerância às condições de inundação, o que torna possível a seleção e o melhoramento genético para essa condição do solo. Essa variação na tolerância, especificamente, em milho, tem sido descrita por Kanwar & Sial (1988) e Parentoni *et al.* (1995). O encharcamento do solo causa estresse oxidativo com danos às proteínas. As modificações oxidativas são caracterizadas pela formação de carbonil nas cadeias de histidina, arginina, lisina e prolina (Shacter *et al.* 1994) e a detecção do grupo carbonil, pela conversão aos derivados do 2,4 dinitrofenilhidrazina, tem sido usada para a quantificação de oxidação protéica (Levine *et al.* 1990). Pesquisas têm demonstrado (Vitorino *et al.* 2001, Dantas 1999) que a adição de cálcio à solução de germinação aumenta a tolerância do milho Saracura em condições de déficit de oxigênio. Estas pesquisas envolveram a adição de cloreto de cálcio no aumento da sobrevivência das plântulas, sob condições de hipoxia, tanto do “Saracura” como também da variedade BR-107 classificada como não tolerante a este tipo de estresse. Estes experimentos foram conduzidos em laboratório, nas fases de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. Assim visualiza-se a necessidade de maiores investigações de como esse elemento influencia a tolerância ao alagamento ao longo do desenvolvimento normal das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de proteína total, oxidação protéica e porosidade de raízes, utilizando-se diferentes doses, fontes e modos de aplicação do cálcio em plantas de milho “Saracura” BRS-4154, sob condições de alagamento.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

O ensaio foi conduzido em regime controlado de casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete lagoas, MG. Foram utilizados vasos de 20 kg de solo proveniente de várzea, com três plantas/vaso. O solo foi adubado de acordo com a recomendação da análise química. Os tratamentos foram constituídos por uma variação de doses de cálcio (300, 500 e 1500 kg ha<sup>-1</sup>), fontes de cálcio (gesso e cloreto de cálcio) e modos de aplicação do adubo (incorporado a 8 cm da superfície, incorporado em todo o solo e sem incorporação). Cada tratamento foi avaliado em condições normais de irrigação e sob encharcamento contínuo imposto a partir do estágio V6. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Foram avaliados na floração os teores de proteína total, oxidada e a porosidade de raízes, tanto no regime de irrigação normal como no encharcado.

O teor protéico foi analisado pelo método de Bradford (1976), empregando-se o *Kit Bio-Rad Protein Assay* (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA). A mistura da reação continha 20 µL do extrato protéico e 200 µL do reagente e a determinação da absorbância foi realizada em 595 nm. A curva padrão foi preparada utilizando-se albumina do soro bovino (BSA) (SIGMA, St. Louis, MO, EUA).

A análise de oxidação protéica foi realizada de acordo com o método de Levine (1990) e o conteúdo de carbonil foi calculado a partir da absorbância a 374 nm, dividida pelo coeficiente de extinção para hidrazonas alifáticas ( $22 \text{ L nmo}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e expresso em nmol de carbonil  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. As reações das proteínas oxidadas com 2,4 dinitrofenilhidrazina, segundo Levine (1990), são:



A porosidade das raízes foi obtida pelo método do picnômetro (Jensen *et al.*, 1969).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No regime de irrigação normal, os menores teores de proteínas totais nas raízes de milho foram encontrados nos tratamentos com as dosagens de 500 e 1500 Kg  $\text{ha}^{-1}$  de gesso incorporado a 8 cm da superfície do solo. O maior teor foi obtido com a aplicação de 1500 Kg  $\text{ha}^{-1}$  de gesso sem incorporação (**Tabela 1**). Observou-se também que os teores de proteína sob irrigação normal apresentaram valores bem superiores aos encontrados no regime encharcado (**Tabelas 1 e 3**). Este resultado deve-se ao fato do estresse por encharcamento degradar as proteínas causando assim o seu decréscimo (Lopes *et al.* 2005). Verificou-se portanto que a presença do cálcio, em diferentes dosagens e modos de aplicação, não foi suficiente para proteger as proteínas da degradação em condições de baixo teor de oxigênio. De acordo com Sacks *et al.* 1980, sob condições de anoxia ou hipoxia, a síntese protéica é limitada, ocorrendo variações consideráveis na qualidade de proteínas que estão sendo sintetizadas. Neste contexto, a síntese de algumas delas é aumentada e a de outras é diminuída e até mesmo inibida. De maneira geral aquelas proteínas que têm sua síntese aumentada ou inibida estão relacionadas aos metabolismos anaeróbico e aeróbico respectivamente.

Com relação à oxidação protéica não foi detectada diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, sob o mesmo regime de irrigação normal (**Tabela 2**). Entretanto, quando comparado com os tratamentos encharcados os teores de proteína oxidada foram menores (**Tabelas 2 e 4**). Estes resultados mostraram uma relação inversa entre teores de proteína e oxidação protéica, confirmando com isto, a influência do estresse de oxigênio que ocorre nos tratamentos sob encharcamento do solo.

As **Tabelas 3 e 4** mostram que, sob um mesmo regime de irrigação, tanto o teor de proteína total como oxidação proteica foram semelhantes estatisticamente entre os diversos tratamentos. Percebe-se assim que as diferentes dosagens de cálcio e modos de aplicação não foram capazes de influir no mecanismo de proteção das plantas a ponto de provocar diferenças entre os tratamentos para as características em questão.

Observa-se na **Tabela 5** que não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas para porosidade de raízes nos diversos tratamentos com cálcio sob irrigação normal. Já nos tratamentos sob regime de encharcamento do solo houve diferenças (**Tabela 6**). A maior porosidade foi verificada na testemunha, que não recebeu cálcio, enquanto a menor porosidade foi observada com a aplicação de 300 kg  $\text{ha}^{-1}$  de cloreto de cálcio

incorporado a 8 cm da superfície do solo. A porosidade de raízes é o principal mecanismo utilizado pelo milho Saracura para tolerar as condições de encharcamento do solo (Magalhães et al. 2000, Magalhães et al. 2001, Romero et al. 2003). Trabalhos conduzidos em laboratório revelaram que a adição do cálcio ao meio aumenta a tolerância ao encharcamento (Vitorino et al. 2001), no entanto nesta pesquisa este efeito não foi ratificado através do aumento da porosidade de raízes. Este resultado deve, muito provavelmente, às condições em que os dois ensaios foram conduzidos, as quais foram bem distintas. A presente pesquisa foi conduzida em casa de vegetação utilizando o solo como meio e com durabilidade até o florescimento da cultura, enquanto que no trabalho de Vitorino e colaboradores, o meio utilizado foi papel toalha imerso em tampão de algamento, e as avaliações foram restritas às fases de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas.

**TABELA 1.** Teor de proteína total em raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de irrigação normal.

Tratamentos	Proteína total (mg proteína/g peso de fresco de raiz )
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	1,03 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	0,97 ab
Sem cálcio (testemunha)	0,88 abc
300 kg ha <sup>-1</sup> de Cloreto de cálcio incorporado em todo o solo	0,78 abc
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	0,72 abc
300 kg ha <sup>-1</sup> Cloreto de cálcio incorporado a 8 cm da superfície	0,70 bc
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	0,70 bc
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	0,66 bc
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	0,63 c
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	0,58 c

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

**TABELA 2.** Oxidação protéica em raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de irrigação normal.

Tratamentos	Oxidação protéica (nmol de carbonil mg <sup>-1</sup> de proteína)
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	3,32 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	3,29 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	3,22 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	2,88 a
Sem Cálcio (testemunha)	2,72 a
300 kg ha <sup>-1</sup> cloreto de Cálcio incorporado a 8 cm da superfície	2,71 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	2,65 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio incorporado em todo o solo	2,34 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	2,05 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	1,88 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

**TABELA 3.** Teor de proteína total em raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de encharcamento do solo.

Tratamentos	Proteína total (mg proteína/g peso de fresco de raiz )
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	0,48 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	0,47 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	0,38 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	0,37 a
300 kg ha <sup>-1</sup> cloreto de Cálcio incorporado a 8 cm da superfície	0,36 a
Sem Cálcio (testemunha);	0,36 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio incorporado em todo o solo	0,34 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo;	0,33 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	0,32 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	0,31 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

**TABELA 4.** Oxidação protéica em raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de encharcamento do solo.

Tratamentos	Oxidação protéica (nmol de carbonil mg <sup>-1</sup> de proteína)
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio incorporado em todo o solo	9,00 a
Sem Cálcio (testemunha)	8,55 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	8,23 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	8,17 a
300 kg ha <sup>-1</sup> cloreto de Cálcio incorporado a 8 cm da superfície	7,26 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	7,15 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	6,74 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	5,79 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	5,47 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	5,09 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

**TABELA 5.** Porosidade de raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de irrigação normal.

Tratamentos	Porosidade de raízes (%)
500 ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	9,14 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de Cloreto de cálcio incorporado em todo o solo	8,72 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de Cloreto de cálcio incorporado a 8 cm da superfície	8,65 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	8,38 a
1500 ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	7,78 a
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	7,71 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	7,57 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	7,52 a

Sem cálcio (testemunha)	7,42 a
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	6,58 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

TABELA 6. Porosidade de raízes de milho “Saracura” submetido a diferentes tratamentos com cálcio, sob regime de encharcamento do solo.

Tratamentos	Porosidade de raízes (%)
Sem cálcio (testemunha)	7,96 a
300 kg ha <sup>-1</sup> de Cloreto de cálcio incorporado em todo o solo	7,09 ab
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	5,16 abc
500 ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	4,98 abcd
300 kg ha <sup>-1</sup> de cloreto de Cálcio sem incorporar	4,51 bcd
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado em todo o solo	4,17 bcd
1500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	3,93 cd
500 kg ha <sup>-1</sup> de gesso incorporado a 8 cm da superfície	3,92 cd
1500 ha <sup>-1</sup> de gesso sem incorporar	3,11 cd
300 kg ha <sup>-1</sup> de Cloreto de cálcio incorporado a 8 cm da superfície	1,93 d

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de tuckey

## LITERATURA CITADA

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248, 1976.

DAMARTY, M.; MORUAN, C.; THELLIER, M. Calcium and Cell. **Plant cell Environmental**, Oxford, V 7, p. 441-448. 1984.

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. Lavras: UFLA, 43 p. (Dissertação de Mestrado- Fisiologia Vegetal), 1999.

KANWAR, R. S. and SIAL, J.K. Effects of waterlogging on growth on corn. In: ICID EUROPEAN REGIONAL CONFERENCE, 15, Dubrovnik, Yugoslavia, 1988. **Proceeding.....** Dubrovnik: Luterrational Comission on Irrigation and Drainage. V 2, p 167-171. 1988.

JENSEN, C. R.; LUXMOORE, R. J.; VAN GUNDY, S. D.; STOLZY, L. H. Root air space measurements by a pycnometer method. **Agronomy Journal**, Madison, v. 61, n. 3, p. 474-475, 1969.

LEVINE, R. L.; GALARD, D.; OLIVIER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENTE, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymology**, Oxford, v. 186, p. 464-478, 1990.

LOPES, M. J. C.; SOUZA, I. R. P.; MAGALHÃES, P. C.; GAMA, E. E.G.; ALVES, J. D.; MAGALHÃES, M. M. Oxidação protéica e peroxidação lipídica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho “Saracura”, sob encharcamento contínuo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.4, n.3, p. 362-373, 2005.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; ANDRADE, C. de L. T. de ; OLIVEIRA, A. C. de; GAMA E. E. G. Adaptação do milho a diferentes condições de alagamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlandia, MG. **Resumos expandidos...** Uberlandia: ABMS, 2000. CD-ROM.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; ANDRADE, C. de L. T. de; OLIVEIRA, A. C. de; SOUZA, I. R. P. de; GAMA E. E. G. Adaptação do milho a diferentes condições de alagamento. In: CONGRESSO NACIONAL DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus, BA. **Resumos expandidos...** Ilhéus: CNFV, 2001. CD-ROM.

PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; MAGNAVACA, R.; MAGALHÃES, P. C. Selection for tolerance to waterlogging in maize (*Zea mays* L.). In: **Simpósio Internacional sobre estresse abiótico**. Belo Horizonte, MG. – Brasil. p. 434-449. 1995.

ROMERO, J. L.; MAGALHÃES, P. C.; ALVES, J. D.; DURÃES, F. O. M. ; VASCONCELLOS, C. A. Efeito do cálcio sobre algumas características biofísicas e morfológicas de plantas de milho BRS-4154 submetidas ao alagamento do solo. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.2, n.3, p. 21-33, 2003.

SACKS, M. M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic protein of maize. *Cell*, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 761-767, 1980.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J. A.; LIM, M.; LEVINE, R. L. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*, Oxford, v. 17, n. 5, p. 429-437, Nov. 1994.

VITORINO, P. F. P. G.; ALVES, J.D.; MAGALHÃES, P.C.; MAGALHÃES, M.M.; LIMA, L.C.O & OLIVEIRA, L.E.M. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. *Pesq. Agropec. Bras*, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.