UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

# ATIVIDADE AMILOLÍTICA E QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.) SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO

**BÁRBARA FRANÇA DANTAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de Botucatu, para obtenção de título de Doutor em Agronomia- Área de Concentração em Agricultura.

**BOTUCATU-SP**
**Setembro - 2002**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

# ATIVIDADE AMILOLÍTICA E QUALIDADE DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.) SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO

**BÁRBARA FRANÇA DANTAS**
**(Engenheira Agrônoma, MSc)**

Orientador: Prof. Dr. João Domingos Rodrigues
Coorientadora: Prof. Dra. Ana Catarina Cataneo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de Botucatu, para obtenção de título de Doutor em Agronomia- Área de Concentração em Agricultura.

**BOTUCATU-SP**
**Setembro - 2002**

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Bárbara França Dantas, filha de Mario Soter França Dantas e de Sandra Maria Gomes Dantas, nasceu na cidade de São Paulo-SP aos 3 dias de junho de 1973.

Formada em Agronomia em julho de 1997, fez Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Lavras, sob a orientação do Prof. Dr. José Donizeti Alves, concluindo em julho de 1999. O Doutorado em Agronomia/ Agricultura iniciou-se logo em seguida na Universidade Estadual Paulista, sob orientação do Prof. Dr. João Domingos Rodrigues, sendo concluído em setembro de 2002.

Em outubro de 2001, Bárbara França Dantas foi contratada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa. Lotada na Embrapa Semi-Árido, em Petrolina-PE, a autora desenvolve pesquisas com fisiologia de videira para produção de vinhos finos e fisiologia de sementes da Caatinga.

.

**DEDICATÓRIA**

A todos aqueles que acreditaram em mim e me apoiaram
durante todos os meus anos de estudo e trabalho que se passaram
e a todos aqueles que acreditarão em mim e me apoiarão
durante os dias de estudo e trabalho que virão

**DEDICO:**

Meus pais Mario Sóter França Dantas e Sandra Maria Gomes Dantas

**Gratidão eterna.**

Aos meus irmãos, Alessandro França Dantas e Cristiane França Dantas
Ao meu esposo e companheiro de todas as horas, Carlos Alberto Aragão.

**Meus agradecimentos.**

A meu pai, meu herói e meu exemplo
Mario Soter França Dantas , a minha

**HOMENAGEM.**

# AGRADECIMENTOS


- À Faculdade de Ciências Agronômicas/UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade da realização do Curso.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. João Domingos Rodrigues por toda a amizade e apoio durante a realização deste trabalho.
- À minha coorientadora, Prof. Dra. Ana Cataria Cataneo pela grande amiga que ganhei e pelo apoio nas horas que eu mais precisei.
- À Coordenadoria de Apoio e Pesquisa ao Ensino Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de estudos para o meu Curso de Doutorado.
- Aos Professores do Curso de Pós-graduação João Nakagawa, Cláudio Cavariani e João Pessoa Araújo Neto, pelos ensinamentos e convívio.
- Aos Professores José Donizeti Alves, Massanori Takaki, Elisabeth Orika Ono e João Nakagawa, pelas valiosas sugestões na Tese.
- Às amigas, Elza, Luciana, Patrícia Leitão, Patrícia Bosso, Andréa Gobbi, para que nossa amizade não fique só em Botucatu.
- Aos amigos da pós graduação, Marcelo & Elza, Rodrigo & Luciana, Eduardo & Patrícia, Drolhe & Lucila, Recco & Morais, Edwin & Max, pelos momentos mais divertidos.
- Os pessoal do Laboratório de Sementes Valéria, Claudemir e Marcinha; do Laboratório de Virologia Karina, Valéria, Tânia e Patrícia; e do Laboratório de Bioquímica, Leonardo, Guilherme e Karina pela amizade e descontração nas horas de trabalho.
- A toda a minha família pelo apoio, carinho e compreensão mesmo que à distância.
- Ao amor da minha vida, minha esposo Carlos por tudo.
- A todos que participaram de alguma maneira para realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....vii

1 RESUMO.....1

2 SUMMARY.....3

3 INTRODUÇÃO.....5

4 REVISÃO DE LITERATURA..... 8

5 MATERIAL E MÉTODOS.....17

5.1 Local.....17

5.2 Material.....17

5.3 Imposição dos tratamentos de hipoxia.....18

5.4 Avaliações da qualidade fisiológica das sementes.....19

5.4.1 Porcentagem de germinação.....19

5.4.2 Testes de vigor.....19

5.4 Extração e ensaio de α-amilase e amilases totais.....21

5.5 Germinação na presença de ácido giberélico e cloreto de cálcio.....22

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....23

7 CONCLUSÕES.....56

8REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....57

# LISTA DE FIGURAS

Figura Página

1 Germinação (%) de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....24

2 Primeira contagem do teste de germinação (%) de sementes de milho cv.BRS1454-Saracura e CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....27

3 Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após diferentes períodos de hipoxia.....30

4 Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após diferentes períodos de hipoxia.....32

5 Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após diferentes períodos de hipoxia.....33

6 Emergência em campo de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34, cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....35

7 Crescimento da parte aérea de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34, cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....37

8. Crescimento da raiz principal de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....39

9. Razão entre parte aérea e raiz principal de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....41

10. Atividade amilolítica durante a germinação de sementes de milho das cultivares BRS1454-Saracura e CATI- AL34.....44

11 Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....46

12 Atividade de α-amilase de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34, cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.....47

13 Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia e germinadas em soluções de 0,375%$CaCl_2$; 100mg.$L^{-1}$GA; 0,375% $CaCl_2$ +100mg.$L^{-1}$GA e água destilada.. 49

14 Atividade de α-amilase de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia e germinadas em soluções de 0,375%$CaCl_2$; 100mg.$L^{-1}$GA; 0,375% $CaCl_2$ +100mg.$L^{-1}$GA e água destilada.....53

## 1 RESUMO

Foram realizadas análises de qualidade fisiológica, bem como ensaios enzimáticos de α-amilase e amilases totais em sementes de milho, cv. Saracura BRS4154 e CATI AL34, submetidas a diferentes períodos de deficiência de oxigênio (hipoxia), com a finalidade de avaliar a resposta das sementes a essa condição. Para tanto, as sementes das cultivares AL34 e Saracura foram submersas em 50mL de água destilada e incubadas em germinadores a 27$^{o}$C, no escuro, durante 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias. Após esse período foram realizados testes de germinação e vigor (primeira contagem do teste de germinação, condutividade elétrica, crescimento de plântulas, emergência das plântulas em campo, índice de velocidade de emergência e tempo médio de emergência). Para a avaliação da atividade de α-amilase e de amilases totais, as sementes submetidas aos períodos de submersão foram divididas em quatro grupos. Um grupo foi prontamente congelado e os outros três foram semeados em gerbox e mantidas a 27$^{o}$C durante 2, 4 e 7 dias. Para a extração das enzimas amilolíticas, retirou-se os tecidos de reserva das sementes, que foram macerados em tampão TRIS-HCl 0,1mol.L$^{-1}$, pH 7, contendo NaCl 0,1mol.L$^{-1}$e $CaCl_2$ 10mmol.L$^{-1}$ e centrifugadas a

12.000*g*, 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi congelado até a realização dos ensaios. A atividade de amilases totais e de α-amilase foi medida em um sistema de reação, contendo Acetato de sódio 50mmol.$L^{-1}$, pH 5,2 e $CaCl_2$ 10mmol.$L^{-1}$ e amido solúvel de batata 2,5% como substrato, incubado a 35°C durante 15minutos. Para inativar outras amilases, permanecendo apenas a α-amilase, o extrato cru foi mantido a 70°C, durante 15 minutos. A atividade amilolítica foi expressa em mmol de açúcares redutores produzidos pela degradação de amido, por mg de proteína, por minuto. Após os períodos de hipoxia as sementes foram semeadas em papel germitest embebido em soluções de 100mg.$L^{-1}$ de $GA_3$, 0,375% de $CaCl_2$ e 100mg.$L^{-1}$ de $GA_3$ + 0,375% de $CaCl_2$ para avaliação da porcentagem de germinação, primeira contagem, crescimento de plântulas e atividade de α-amilase e amilases totais. Os resultados indicam que as sementes de ambas as cultivares são tolerantes à hipoxia, mas houve inibição da degradação e mobilização das reservas. O cálcio e o ácido giberélico isoladamente não tiveram efeito significativo nas sementes submetidas à submersão. No entanto, em solução de cloreto de cálcio combinado com ácido giberélico as condições para a germinação e degradação de reservas das sementes foram favorecidas.

MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDS AMYLOLITIC ACTIVITY AND PHYSIOLOGICAL QUALITY WHEN SUBJECTED TO FLOODING. Botucatu, 2002. 56p. Dissertação (Doutorado em Agronomia/ Agricultura)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: BÁRBARA FRANÇADANTAS

Adviser: JOÃO DOMINGOS RODRIGUES

Co-adviser: ANA CATARINA CATANEO

## 2 SUMMARY

Maize seeds cultivars Saracura BRS-4154 and CATI AL34, subjected to several flooding periods, were accessed for physiological quality and total amylase and α-amylase activity aiming to evalute seeds response to this condition. The seeds were submerged in 50mL of distilled water and incubated at 27$^{o}$C, in the dark during 0, 1, 2, 3, 4 and 5 days. After that, germination and vigor (first counting, electrical conductivity, seedlings growth, seedlings field emergence, germination index and germination speed) tests were carried out. For the amylolitic activity, the seeds subjected to hypoxia were divided in four portions. One portion was readily frozen and the other three were germinated during 2, 4 and 7 days. The enzymes were extracted by the seeds reserve tissues homogenization in buffer 0.1mol.L$^{-1}$ TRIS-HCl, pH 7, with 0.1mol.L$^{-1}$ NaCl and 10mmol.L$^{-1}$ $CaCl_2$. After that, the solution with the homogenized tissues was centrifuged at 12000*g* at 4$^{o}$C during 10 minutes. The pellet was discarded. The amylolitic activity was measured in a reaction buffer containing, sodium acetate 50mmol.L$^{-1}$, pH 5.2 and $CaCl_2$ 10mmol.L$^{-1}$ along with soluble potato starch 2.5% as

substrate incubated at 35°C during 15minutes. To inactivate other amylases, and purify α-amylase, the crude extract was incubated at 70°C, during 15 minutes. The amylase activity was expressed in reducing sugars mmol produced by starch degradation per protein mg, per minute. After the hypoxia periods the seeds were germinated in germitest paper imbibed in 100 $mg.L^{-1}$ $GA_3$, 0.375% $CaCl_2$ and 100 $mg.L^{-1}$ $GA_3$ + 0.375% $CaCl_2$ solutions and assessed for germination and vigor tests and amylolitic activity. The results indicate both cultivars are tolerant to hypoxia but had their reserve degradation and mobilization inhibited by oxygen deficiency. Calcium and GA individually have no effect on submerged seeds, but when combined they have synergistic effect and improving the conditions for germination and reserve degradation of germinating seeds.

Keywords: germination, hypoxia, α-amylase

## 3 INTRODUÇAO

A germinação de sementes de cereais é um dos processos fisiológicos mais estudados, devido à grande importância desses na nutrição humana. No entanto, a maioria dos trabalhos realizados com sementes descreve o processo aeróbico e apenas pequena quantidade de trabalhos se refere às vias que operam sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio durante a germinação.

O papel do reajuste metabólico no estresse por alagamento tanto em plantas adultas, como em sementes tem sido, recentemente, motivo de grandes controvérsias. Existem quatro aspectos principais de discussão, sendo eles, (1) a maioria dos cientistas assumem que o alagamento leva a uma condição anaeróbica, que seria o único fator de estresse, ignorando os danos nas sementes causados pela embebição repentina. (2) Devido a esse fato, vários estudos têm enfocado a respiração anaeróbica e a quantificação de seus produtos, como o etanol, e discutido a importância destes na injúria pelo alagamento. (3) A tendência de classificar as sementes em estritamente tolerantes ou não tolerantes leva a acreditar na existência de uma enzima chave presente ou ausente nesses grupos. Após

inúmeros trabalhos, tal enzima ainda não foi encontrada. (4) O alagamento pode levar a mudanças no metabolismo secundário que se confundem com as modificações do metabolismo primário, levando a conclusões errôneas.

Durante os estádios iniciais da germinação, as sementes iniciam rapidamente o metabolismo energético e a ativação da via glicolítica se torna mais rápida que o desenvolvimento das mitocôndrias, fazendo com que as sementes acumulem piruvato. Desta forma, há um desvio da via aeróbica para a via fermentativa, durante um pequeno período da germinação das sementes. Neste contexto, acredita-se que as sementes que embeberam se tornam anaeróbicas até a emergência da raiz primária. As sementes de milho, em particular, quando em ambientes alagados, estendem sua fase anaeróbica até a drenagem da água e as condições de oxigênio voltem ao normal e, a partir de então, emitem a radícula.

A maioria das sementes de plantas superiores não consegue germinar em condições anóxicas (ausência de oxigênio) ou hipóxicas (baixa quantidade de oxigênio). As sementes amiláceas possuem maior tolerância a condições alagadas que sementes oleaginosas ou protéicas. No entanto, entre os cereais, apenas o arroz (*Oryza sativa* L.) consegue germinar e alongar seu coleóptile em condições anóxicas. Essa diferença de comportamento sugere que a presença do amido pode ser um dos mecanismos, mas acredita-se que não seja o único, a garantir a tolerância das sementes à anaerobiose.

O uso de ácido giberélico ($GA_3$) e de cálcio na germinação de sementes têm sido muito usadas para induzir uma melhor e mais rápida germinação em condições de dormência, estresse e baixo vigor das sementes.

O objetivo deste trabalho é avaliar a qualidade fisiológica e degradação de amido nas sementes de duas cultivares de milho submetidas ao alagamento e o efeito do cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e $GA_3$ nessa resposta.

# 4. REVISÃO DE LITERATURA

## 4.1 Degradação e mobilização de reservas das sementes

A mobilização das reservas das sementes ocorre após o alongamento e emissão da raiz primária, sendo, portanto um evento pós-germinativo, no entanto, a degradação dessas reservas se inicia nas primeiras horas de embebição das sementes não dormentes (Bewley & Black, 1985). Concomitante com a degradação das reservas insolúveis de alto peso molecular, ocorre a sua conversão a formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de matérias primas (proteínas, ácido nucléicos, carboidratos e lipídeos) para a construção de novos tecidos e células (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). As modificações metabólicas que ocorrem nesses estágios são resultado da atividade de várias enzimas de hidrólise e transferência (Bewley & Black, 1985).

Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1985), as enzimas de degradação de reservas podem ou não estar presentes nas sementes quiescentes. As enzimas

*pré-existentes* 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).

As substâncias de reserva de sementes são carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, compostos contendo fósforo (fitatos) e minerais (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). Considerando-se o principal composto armazenado, as sementes podem ser divididas entre aquelas ricas em carboidratos, as ricas em lipídios e as ricas em proteína (Carvalho & Nakagawa, 2000). Em sementes de cereais, as principais substâncias de reserva são os carboidratos, chegando a até 70 % do total da semente, seguidos pelas proteínas que constituem 8 a 15% das sementes (Zamski, 1995). As sementes de milho possuem em média 83% da matéria seca constituída por carboidratos, entre eles, amido, frutosanas e polissacarídeos da parede celular e monossacarídeos (Carvalho & Nakagawa, 2000 e Buckeridge et al., 2000). 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).

O amido é um polímero de glicose, organizado em estruturas granulares insolúveis, denominadas grãos de amido, e constituído de dois tipos de moléculas, a amilose e a amilopectina (McLeod, 1974). A amilose apresenta cadeia linear, com ligações glicosídicas $\alpha$-1,4 e compõe 25% a 30% do amido total da semente de milho comum e cerca de 75% de sementes de cultivares de milho com alto teor de amilose. A amilopectina apresenta ligações $\alpha$-1,4 e $\alpha$-1,6, originando uma cadeia ramificada. Seu teor varia entre 75% do amido

total em sementes de cultivares de milho comum e 99% do amido em sementes de milho ceráceo, também denominado waxy (Medcalf, 1973; Sisvak & Preiss, 1995; Zamski, 1995). Devido à sua característica granular e insolúvel, o amido da semente é resistente ao ataque enzimático (Fannon et al., 1992). O início de sua degradação, portanto, requer enzimas especializadas que, geralmente, não existem ou têm atividade muito baixa na semente madura e quiescente (Zeigler, 1995). Sendo assim, a produção de um mecanismo de degradação do amido altamente eficiente é um dos fatores chave para a germinação e vigor das sementes.

A degradação do amido durante a germinação ocorre por meio de duas vias, a via hidrolítica (amilolítica) e a via fosforolítica (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). A via fosforolítica ocorre através de mecanismos que envolvem a fosforilação direta de resíduos de glicose terminais (Bewley & Black, 1985). Essa via parece ser exclusiva do amido, pois, até o momento não foi detectada a presença de um mecanismo semelhante em outros polissacarídeos, como os frutanos e polissacarídeos de parede celular, devido ao alto custo energético desse processo, inviáveis do ponto de vista evolutivo (Somme, 1970; Reid, 1971; Buckeridge et al., 2000).

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, 1991). 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 (1991), só a ação conjunta das diversas hidrolases,

como a α-amilase, β-amilase, enzimas desramificadoras e α-glucosidase, resulta na degradação completa do amido.

## 4.2 Regulação da degradação de carboidratos de reserva em cereais

### 4.2.1 Papel do ácido giberélico

De acordo com Dure (1960), a α-amilase não está presente em sementes quiescentes, sendo sintetizada *denovo* durante a germinação e secretada para o endosperma amiláceo por dois tecidos, o escutelo e a camada de aleurona.

Haberlandt (1890), citado por Ashford & Gubler, (1984) observou que a secreção de enzimas de degradação do amido dependia da presença do embrião, quando este era retirado não havia degradação, mesmo após um longo período de hidratação. No entanto, os endospermas, quando hidratados próximos aos embriões isolados, a degradação de amido era observada. Dessa forma foi verificado que o embrião produz uma substância que se difunde no meio e induz a síntese de α-amilase. Sendo assim, foi concluído que a síntese dessa enzima ocorre em resposta a sinais produzidos pelo embrião durante a germinação.

Até a década de 60, no entanto, não se conhecia nada a respeito desses sinais. Foi então que Paleg (1960) verificou que em meia-sementes, mesmo na ausência do embrião, soluções de $GA_3$ estimularam a atividade de α-amilase em cevada.

O papel do $GA_3$ se tornou mais claro em meados da década de 90, quando Lenton et al. (1994) verificaram que o embrião da semente produz e libera $GA_1$ no endosperma. Concluiu-se, então, que o embrião regula a mobilização das reservas da semente

através da secreção de GA que estimula uma via da transdução na camada de aleurona e no escutelo, culminando com a transcrição de mRNA de α-amilase (Lenton et al., 1994).

O uso de giberelinas na fase de germinação pode melhorar a performance de sementes de várias espécies, principalmente, sob condições adversas (Bevilaqua et al., 1993; Cunha & Casali, 1989). O ácido giberélico, considerado por Levitt (1974) um ativador enzimático endógeno, promove a germinação, sendo que, a aplicação exógena deste promotor influencia o metabolismo protéico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas das sementes (Mc Donald & Khan, 1983).

Segundo Salisbury & Ross (1991), na maioria das espécies, as giberelinas atuam no alongamento celular, fazendo com que a raiz primária rompa os tecidos que restringem o seu crescimento, como o endosperma, o tegumento da semente ou estruturas do fruto. Em sementes de alface, colocadas para germinar em condições de escuro a 20$^{o}$C, o ácido giberélico estimulou a germinação das mesmas, quando submetidas a concentrações de 25; 50; 100 e 200mg.L$^{-1}$ (Cunha & Casali, 1989).

### 4.2.2 Papel do cálcio

O cálcio é um elemento que participa de vários processos fisiológicos nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Sua atividade depende da concentração e localização na célula (Trewawas, 2000). Ao contrário dos outros nutrientes, a maior proporção encontra-se localizada no apoplasto (Seling et al., 2000), estabilizando ligações entre as substâncias pécticas da parede celular ou como reserva no vacúolo.

Um dos papéis mais importantes do cálcio ($Ca^{2+}$) é o de mensageiro secundário em vias de transdução de sinal em células vegetais, sendo muito estudado por vários autores (Bush, 1995; Yang,1996). Este íon está envolvido em várias respostas de plantas a estímulos ambientais e hormonais em processos celulares e de desenvolvimento (Gerhing et al.,1990).

O $Ca^{2+}$ tem a capacidade de regular grande variedade de processos devido à grande distribuição espaço-temporal dos efetores específicos para esses íons (Yang, 1996). O $Ca^{2+}$ ativa diretamente várias quinases protéicas ou ligada à calmodulina (CaM), formando o complexo $Ca^{2+}$/CaM, que tem por função ativar outras quinases protéicas, resultando em uma reação em cadeia que chega até o núcleo da célula induzindo a expressão de genes específicos (Yang, 1996).

Bush (1995) relatou que o $GA_3$ induz mudanças na concentração citoplasmática de $Ca^{2+}$ nas células de aleurona, que se caracterizam em eventos de transdução de sinal e de regulação da germinação. Foi verificado também que o estímulo da germinação causado pelo GA, causou, anteriormente, aumento na concentração citoplasmática desse íon, representando o sistema de sinalização dependente de calmodulina (Gilory & Jones, 1993; Schuurink et al.,1996).

Gilory (1996) mostrou que grande quantidade das funções da camada de aleurona de sementes de cevada são sinalizadas pelo $Ca^{2+}$. Este autor observou que concentrações citossólicas de $Ca^{2+}$ e de calmodulina aumentam em protoplastos da camada de aleurona tratados com GA, e que antagonistas da calmodulina inibem a secreção de amilases.

Subbaiah et al. (1994) e He et al. (1996) observaram que o défice de oxigênio estimula o influxo de cálcio para o citossol, ativando genes importantes para o

metabolismo anaeróbico. Nas pesquisas desenvolvidas por esses autores, o cálcio estava livre no citosol e sua concentração variou entre 25µM (concentração normal) e 150µM (estresse), faixa em que este elemento atua como um mensageiro secundário de processos celulares (He et al., 1996b; Subbaiah, et al., 1994). Akazaua & Hara-Nishimura (1985) e Fincher (1989) verificaram que o aumento do $Ca^{2+}$ intracelular controlada por biorreguladores induz a produção e secreção de α-amilase em sementes de arroz e cevada.

Purcino (2001) verificou que sementes de milho cv. BRS4154 Saracura submetidas à hipoxia, que tiveram contato mais prolongado com $CaCl_2$ durante a germinação, 3 e 4 dias, apresentaram maior atividade de α-amilase, detectada por eletroforese, que aquelas que não tiveram contato ou que permaneceram menor tempo, 1 e 2 dias, em contato com esse sal.

**4.3 Germinação de sementes em condições de deficiência de oxigênio**

A ativação do processo germinativo requer um adequado suprimento de água e oxigênio. No entanto, quando há excesso de água, a disponibilidade de oxigênio para o embrião diminui, reduzindo ou atrasando a germinação em várias espécies (Kozlowski & Pallardy, 1997). Segundo Kozlowski (2002), a inundação do solo provoca vários efeitos prejudiciais à germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas. O alagamento do solo leva a uma rápida embebição, que causa injúrias ao tegumento das sementes (Hou & Thseng, 1991) e uma baixa disponibilidade de oxigênio (Ponnamperuma, 1972), induzindo um desvio do metabolismo aeróbico para o metabolismo fermentativo (Crawford, 1978; Bertani et al., 1980; Al-Ani et al., 1985; Raymond et al., 1985). Desta forma, a semente já danificada tem

menor quantidade de energia disponível para o processo germinativo, refletindo em menor vigor (Richard et al., 1991).

Em climas tropicais, vários fatores bióticos e abióticos influenciam na perda de viabilidade e vigor das sementes. Entre esses, o excesso de chuva, logo após a semeadura, pode ser um fator limitante à produção, por causar deterioração das sementes levando à menor emergência das plântulas em campo (Duke & Kakefuda, 1981).

Em milho, tanto o encharcamento do solo quanto a submersão das sementes em água, em condições de laboratório, reduzem ou impedem a germinação (Deboer & Ritter, 1970; Fausey & McDonald, 1985; Van Toai et al., 1988; Khosravi & Andersen, 1990). Dantas et al. (2000) observaram que a germinação e o vigor das sementes da cultivar de milho AL30 decresceram imediatamente após estas serem submetidas ao alagamento, havendo decréscimo de 40% a partir do terceiro dia de alagamento e, ao sétimo dia, não houve germinação. Martin et al. (1991) verificaram que a tolerância dessa espécie varia de acordo com a cultivar e com a temperatura de alagamento. A alteração da expressão de genes durante períodos com deficiência de oxigênio, leva a um ajuste metabólico, permitindo às plantas sobreviverem (Drew, 1997) e é regulada ao nível de transcrição e tradução (Sachs et al., 1980; 1996). Algumas plantas apresentam certo grau de tolerância a ambientes hipóxicos pela manutenção da respiração através da via anaeróbica (Sachs et al., 1996), garantindo assim o mínimo de energia necessária para a sua sobrevivência. Essas variações no grau de tolerância à hipoxia ocorrem entre as diferentes espécies e na mesma espécie entre as diferentes cultivares.

McMannon & Crawford (1971) verificaram a presença de enzima málica em raízes de plantas susceptíveis ao alagamento e ausência nas tolerantes. No entanto,

Van Toai et al. (1987) não observaram correlação entre essa ou outra enzima do metabolismo fermentativo e a tolerância de sementes a hipoxia. Al-Ani et al. (1985) e Raymond et al. (1985) verificaram que sementes amiláceas apresentam maior tolerância à deficiência de $O_2$ durante a germinação que sementes oleaginosas, indicando que a tolerância pode estar ligada ao metabolismo do amido durante a germinação.

Perata et al. (1992) verificaram diferenças na atividade de α-amilase entre as variedades *indica* e *japonica* de arroz, quando submetidas a anoxia. A variedade *japonica* (mais tolerante a anoxia) apresentou maior atividade de α-amilase que a variedade *indica*. A partir deste resultado, Richard et al. (1991) concluíram que as reservas de amido poderiam exercer importante papel na manutenção do metabolismo em plântulas de arroz sob anoxia. 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 $O_2$. Alves et al. (2002) em revisão recente sobre este assunto, discutem os mecanismos de tolerância da variedade Saracura BRS-4154 e afirmam que durante a germinação o cálcio atrasa o desenvolvimento das plântulas dessa cultivar preservando as reservas de carboidratos na cariopse. Esses autores, juntamente com Purcino (2001) concluíram que a maior tolerância da cultivar seja caracterizada pela expressão de genes que codificam α-amilase e sacarose sintase, que atuariam como mantenedores do metabolismo anaeróbico. Pouco se conhece, no entanto, sobre a cinética da atividade amilolítica de sementes de milho em condições hipóxicas e sua influência na qualidade fisiológica das sementes.

# 5 MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 Local

As avaliações de germinação e vigor das sementes foram conduzidas no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Produção Vegetal-Setor de Agricultura da Faculdade de Ciências Agronômicas e no Laboratório de Bioquímica de Plantas do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu-SP, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2001.

## 5.2 Material

Foram utilizadas sementes de milho das cultivares CATI-AL34 e Saracura- BRS4154, peneira 20, doadas pela Fazenda Experimental do Lageado (FCA-UNESP) e pela EMBRAPA- Milho e Sorgo, respectivamente.

A cultivar CATI-AL34 é recomendada para solos de baixa a alta fertilidade e com produtividade média de 5.500 $kg.ha^{-1}$. Essa cultivar tem origem no cruzamento ao acaso de cultivares de ciclo normal, obtido após diversas gerações de recombinações e seleção massal, apresentando ciclo semiprecoce. A altura média da planta é de 2,32m e a altura média da inserção da espiga é de 1,40m e apresentando uma boa resistência ao acamamento. As espigas são do tipo cônica com número médio de 14 fileiras de grãos e bom empalhamento. Os grãos são semiduros de coloração amarelo-alaranjado (CATI, 2002).

A cultivar Saracura-BRS4154 é uma variedade de polinização livre e ciclo precoce, selecionada a partir de uma ampla base genética para tolerância ao encharcamento temporário do solo. A altura média da planta é de 2,35m com um empalhamento muito bom. Sua produtividade de 5.000 a 6.500$kg.ha^{-1}$. Os grão são alaranjados do tipo semiduro (EMBRAPA, 2002).

**5.3 Imposição dos tratamentos de hipoxia**

As sementes das cultivares AL34 e Saracura foram submersas em 50mL de água destilada em copos plásticos de 250mL, contendo 50 sementes em cada copo. Para prevenção do crescimento de bactérias e de fungos foram adicionados antibiótico (Ampicilina 100$\mu g.L^{-1}$) e fungicida (Rhodiauram 750$mg.L^{-1}$) à solução de alagamento (Martin et al., 1991). As cariopses submetidas ao alagamento foram, então, incubadas em germinadores a 27$^{o}$C, segundo Martin et al. (1991), no escuro, durante 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias.

## 5.4 Avaliações da qualidade fisiológica das sementes

### 5.4.1 Porcentagem de germinação

Após os períodos em alagamento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), com modificação da temperatura de germinação. A temperatura de 27°C foi utilizada para os testes de germinação e vigor, conforme recomendações de Martin et al. (1991) por ser fisiologicamente mais propícia à germinação e desenvolvimento do milho.

As quatro subamostras de 50 sementes de cada tratamento foram distribuídas em rolo de papel toalha germitest, umedecido com quantidade de água equivalente a 2 vezes o peso do substrato e mantidas em germinador a 27°C, no escuro. As avaliações foram feitas aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais, conforme indicadas nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

### 5.4.2 Testes de vigor

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 Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

A **condutividade elétrica** foi determinada utilizando-se oito repetições de 50 sementes para cada tratamento, as quais foram pesadas e colocadas em um

recipiente com 50mL com água destilada e mantidas em câmara a 27°C e a cada 24 horas até o quinto dia de alagamento, foi feita a leitura da condutividade da solução do exsudato com auxílio de condutivímetro Digimed DM 31, sendo depois calculada a condutividade, em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$, de sementes em função do peso inicial das sementes (AOSA, 1999). Foi determinado, também, o pH das soluções de alagamento com o auxílio de um pHmetro manual portátil.

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 radícula para a parte inferior do papel. Foram confeccionados rolos semelhantes ao teste de germinação (Brasil, 1992) e cinco repetições (cinco rolos) foram agrupadas e colocadas, dentro de sacos plásticos, verticalmente no interior do germinador a 27°C por 4 dias. Após este período mediu-se o comprimento da raiz primária e da parte aérea das plântulas normais. A partir desses dois parâmetros foi obtida a razão entre o comprimento da raiz e o comprimento da parte aérea. Obteve-se, também, neste teste o peso de matéria fresca e seca das 10 plântulas.

Para avaliação da **emergência das plântulas** em campo, foram semeadas 50 sementes por linha, com espaçamento de 5cm entre sementes e 10 cm entre linhas. Cada tratamento foi constituído de três linhas, sendo cada linha uma repetição em delineamento de blocos ao acaso. Foram realizadas contagens diárias de plântulas emergidas durante treze dias contínuos, a partir da semeadura e uma contagem final aos 18 dias após a semeadura.

A partir destes dados foram confeccionadas para cada tratamento curvas de emergência e valores de índice de velocidade de emergência (**IVE**), segundo fórmula proposta por Maguire (1962) e tempo médio de emergência (**TME**, Laboriau, 1983), proposto inicialmente por Edmond & Drapala (1958) com o nome de velocidade de germinação. O IVE e TME são expressos pelas seguintes equações:

$$IVE = \sum_{i=1}^{k} \frac{nai}{ti} \qquad TME = \frac{\sum_{i=1}^{k} niti}{\sum_{i=1}^{k} ni}$$

onde:

*ti*: tempo entre a semeadura e a *i*-ésima observação (dia)
*nai*: número acumulado de plântulas normais que germinaram no tempo *ti*
*ni*: número das plântulas normais que germinaram na *i*-ésima observação
*k*: último dia da observação.

**5.5 Extração e ensaio de** a **-amilase e amilases totais**

Para avaliação da atividade de α-amilase e de amilases totais, as sementes submetidas aos períodos de submersão 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 durante 2, 4 e 7 dias. Após este período as sementes foram, também, congeladas a –20°C.

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 0,1mol.$L^{-1}$, pH 7, contendo NaCl 0,1mol.$L^{-1}$e $CaCl_2$ 10mmol.$L^{-1}$ e centrifugadas a 12.000*g*, 4$^o$C durante 10 minutos, coletando-se o sobrenadante que foi congelado a –20$^o$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$^o$C durante 15minutos. Para inativar outras amilases, permanecendo apenas a α-amilase, o extrato cru foi mantido a 70$^o$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 660nm.

**5.6 Germinação na presença de ácido giberélico ($GA_3$) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$)**

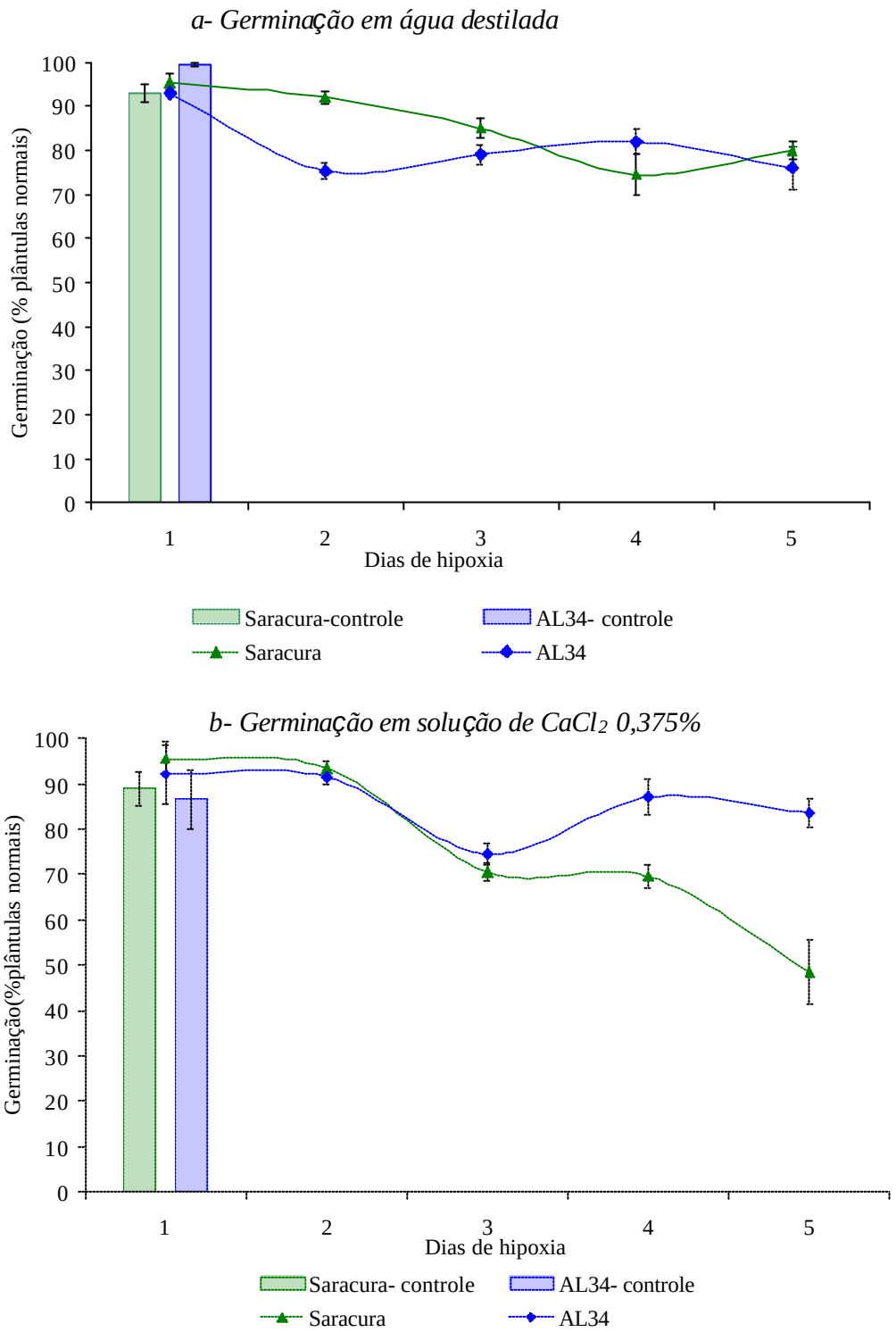
Após os períodos de hipoxia as sementes foram semeadas em papel germitest embebido em soluções de 100 mg.$L^{-1}$ de $GA_3$, 0,375% de $CaCl_2$ e 100 mg.$L^{-1}$ de $GA_3$ + 0,375% de $CaCl_2$ para a avaliação da porcentagem de germinação, primeira contagem, crescimento de plântulas e atividade de α-amilase e amilases totais, conforme descrito nos itens 5.3 e 5.4.

# 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1 Qualidade fisiológica das sementes

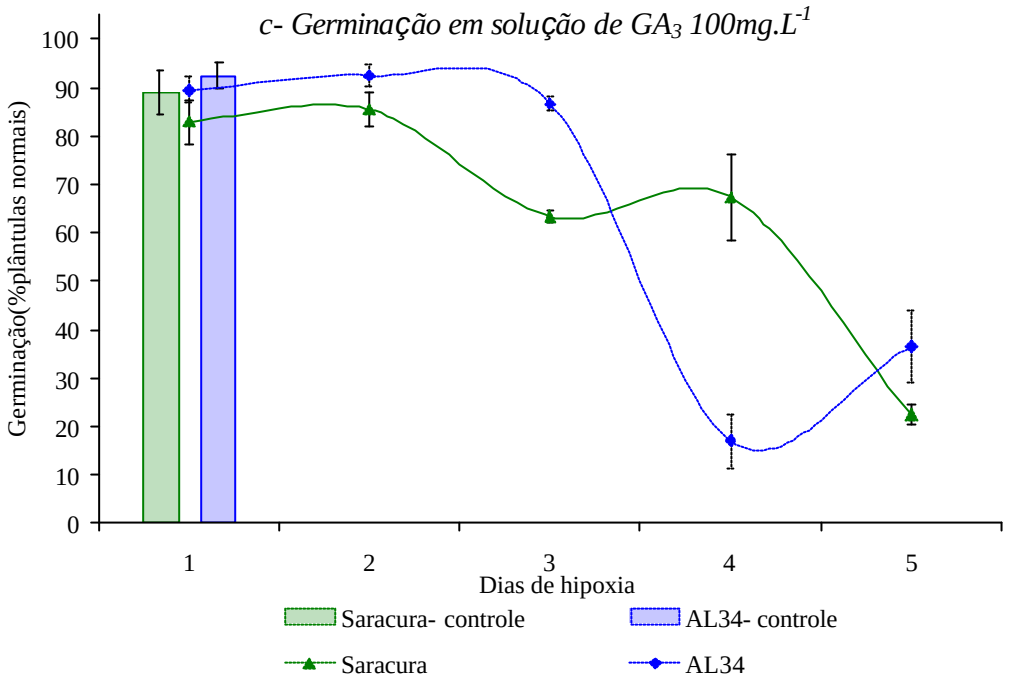
As sementes utilizadas nesse experimento eram recém colhidas e tinham um alto vigor com **germinação** de 99,5% e 93 %, para as cultivares AL34 e Saracura. A **germinação** das sementes da cultivar AL34 diminuiu 24% logo no segundo dia de alagamento, mantendo-se num patamar de cerca de 80% até o quinto dia. A germinação das sementes da cultivar Saracura diminuíram significativamente apenas a partir do quarto dia de alagamento e também se manteve em cerca de 80%, após 5 dias de alagamento(Figura 1a). Foi observado por Martin et al. (1991) e Dantas et al. (2000) que a tolerância da alagamento depende da qualidade fisiológica do lote, neste trabalho as sementes toleraram a condição hipóxica até cinco dias devido ao seu alto vigor.

Verifica-se que as sementes da cv. AL34 apresentaram melhor resposta ao tratamento com cálcio ($Ca^{2+}$) do que as sementes da cultivar Saracura, mantendo uma germinação de aproximadamente 90% durante os períodos de alagamento avaliados (Figura 1b) .




.

Figura 1. Germinação (%) de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



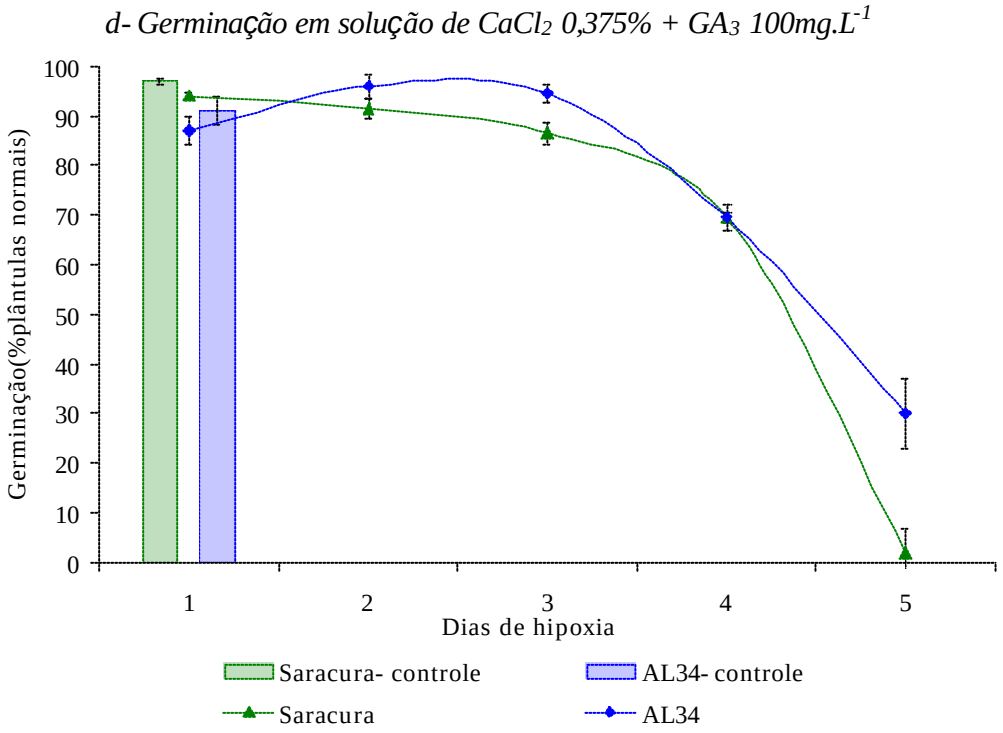




Figura 1. continuação...

Os tratamentos com ácido giberélico ($GA_3$) aumentaram a germinação das sementes da cv. AL34, apenas nos primeiros dias de hipoxia em que as condições não são muito estressantes, no entanto, tiveram efeito negativo nos períodos mais prolongados de alagamento (Figura 1c, d).

Entre os testes de vigor, **a primeira contagem do teste de germinação** é o mais utilizado por refletir a velocidade com que a semente germina (Krzyzanowski et al., 1999). As sementes de Saracura apresentaram maior velocidade e, assim, mais vigorosas que as sementes de AL34 (Figura 2a). Observa-se, por outro lado, que as sementes da cv. AL34 apresentaram maior resposta aos tratamentos com GA e $Ca^{2+}$, em relação à cv. Saracura, com maiores porcentagens de plântulas normais, na primeira contagem, em todos os períodos de hipoxia. Os tratamentos com GA e $Ca^{2+}$ foram semelhantes entre si e apresentaram um efeito significativo na rapidez de germinação das sementes submetidas ao alagamento quando comparadas às sementes germinadas em água destilada, com porcentagens de plântulas normais de até aproximadamente 85% e 92% no tratamento de GA(100 $mg.L^{-1}$) + $Ca^{2+}$(0,375%) para as cultivares Saracura e AL34, respectivamente (Figura 2b, c, d). Esses tratamentos aumentaram a rapidez de germinação apenas nas sementes que apresentavam um maior teor de água, mas ainda não haviam sofrido os efeitos do alagamento, por isso as sementes controle , que não foram submetidas ao alagamento, tiveram baixa porcentagem de plântulas normais. Segundo Alves et al. (2002), a presença do cálcio diminui a velocidade de germinação devido ao seu inibitório em enzimas de degradação da parede celular, desta forma, o rompimento do pericarpo pela radícula fica mais difícil.

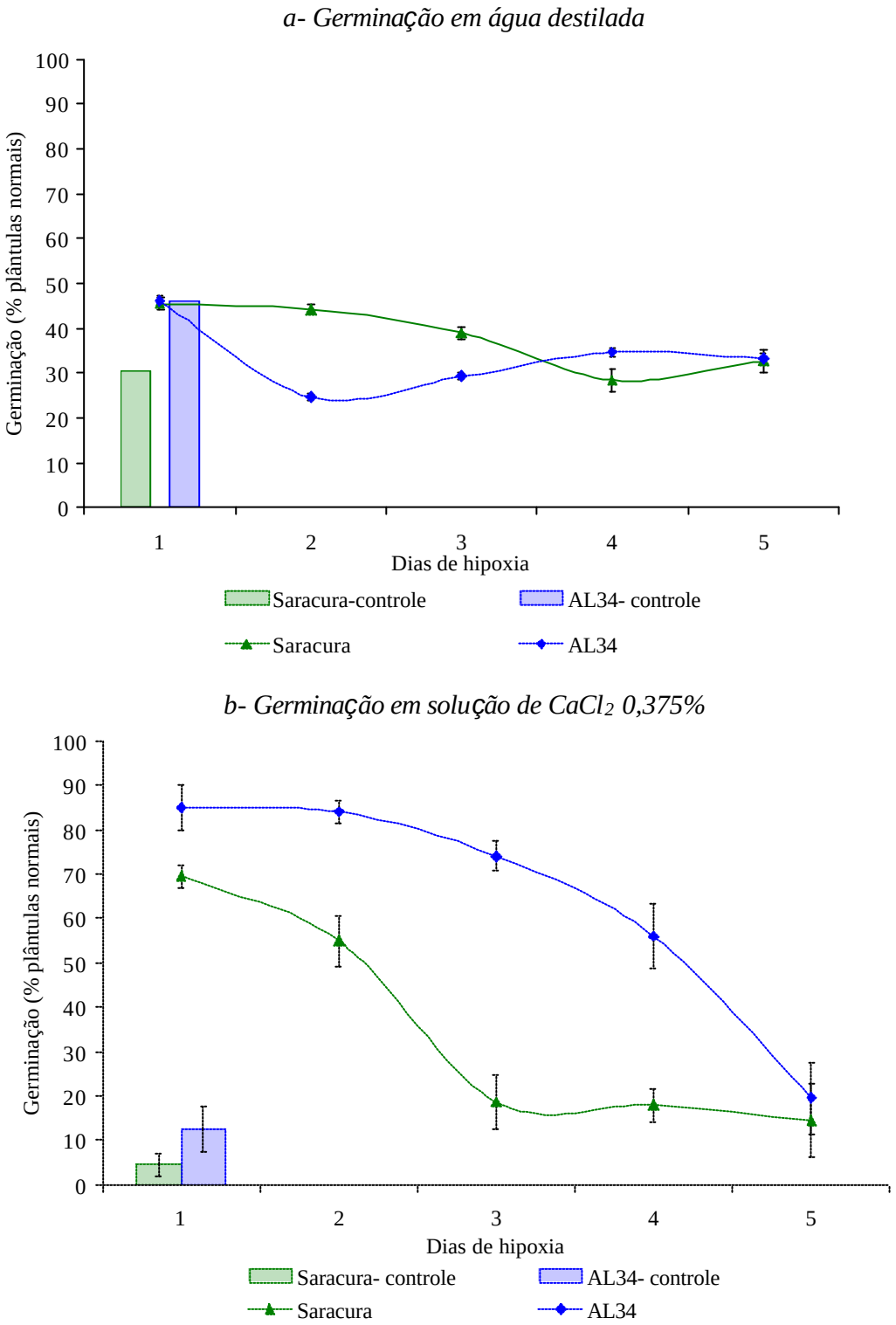
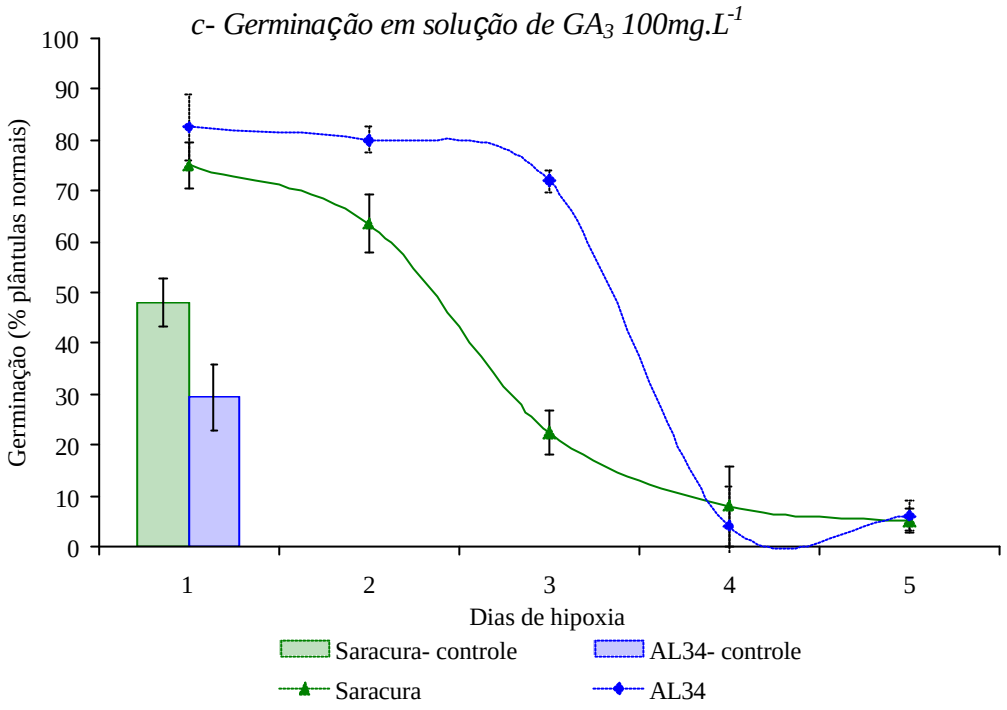



Figura 2. Primeira contagem do teste de germinação (%) de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 submetidas a diferentes períodos de hipoxia. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



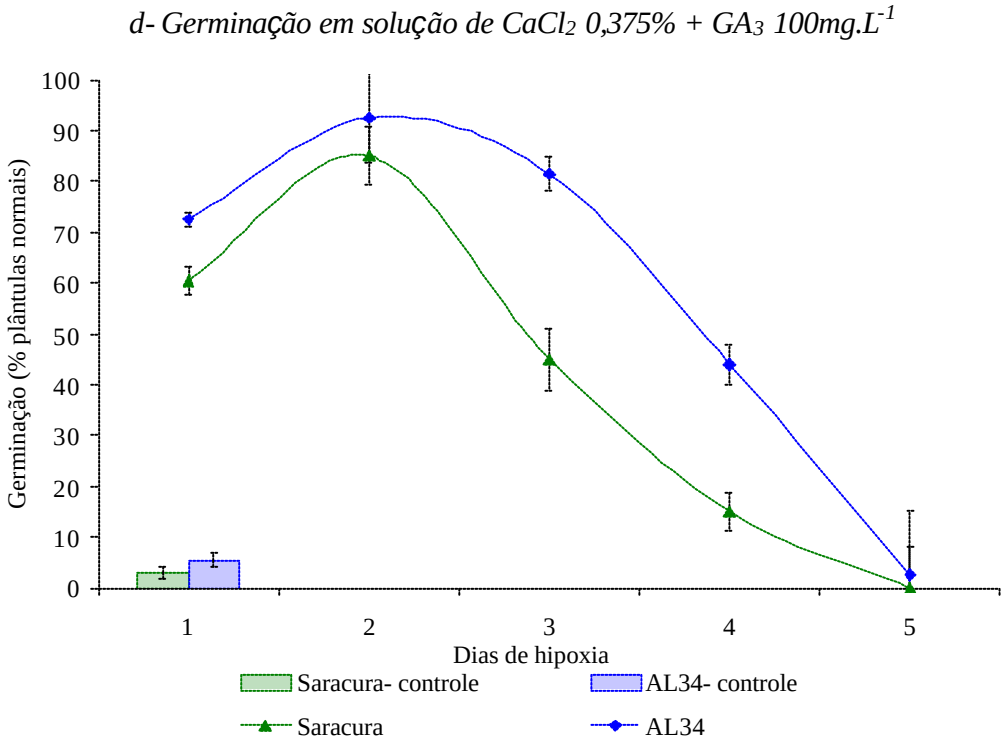




Figura 2. continuação...

Os demais testes de vigor realizados após submeter as sementes à condição hipóxica ou durante essa condição indicam, mais uma vez, que as sementes de ambas as cultivares são tolerantes ao alagamento e que a cv. Saracura apresentam melhor resposta a essas condições. A figura 3a indica que, a **condutividade elétrica** da solução de embebição aumenta bruscamente conforme aumenta o período de alagamento refletindo o dano que ocorre nas membranas celulares. durante a hipoxia. As sementes da cv. Saracura apresentaram menor perda de integridade das membranas celulares, provavelmente devido à maior tolerância ao alagamento que a cv. AL34. Segundo Vieira (1994) o valor da condutividade elétrica é função da quantidade de íons lixiviados na solução, que está diretamente relacionada à integridade das membranas celulares. Essas membranas são essenciais para uma grande quantidade de eventos metabólicos que ocorrem nas sementes, incluindo a respiração nas cristas mitocôndriais, que fornece a energia necessária para a germinação das sementes e crescimento das plântulas. O retículo endoplasmático também se constitui de uma organela membranácea no qual ocorre a tradução do RNA mensageiro (mRNA) e, assim, várias enzimas são sintetizadas. Dessa forma, qualquer modificação no funcionamento das membranas celulares pode diminuir a concentração de ATP na célula e retardar a síntese de enzimas importantes para a germinação das sementes e crescimento inicial das plântulas (Basavarajappa et al., 1991).

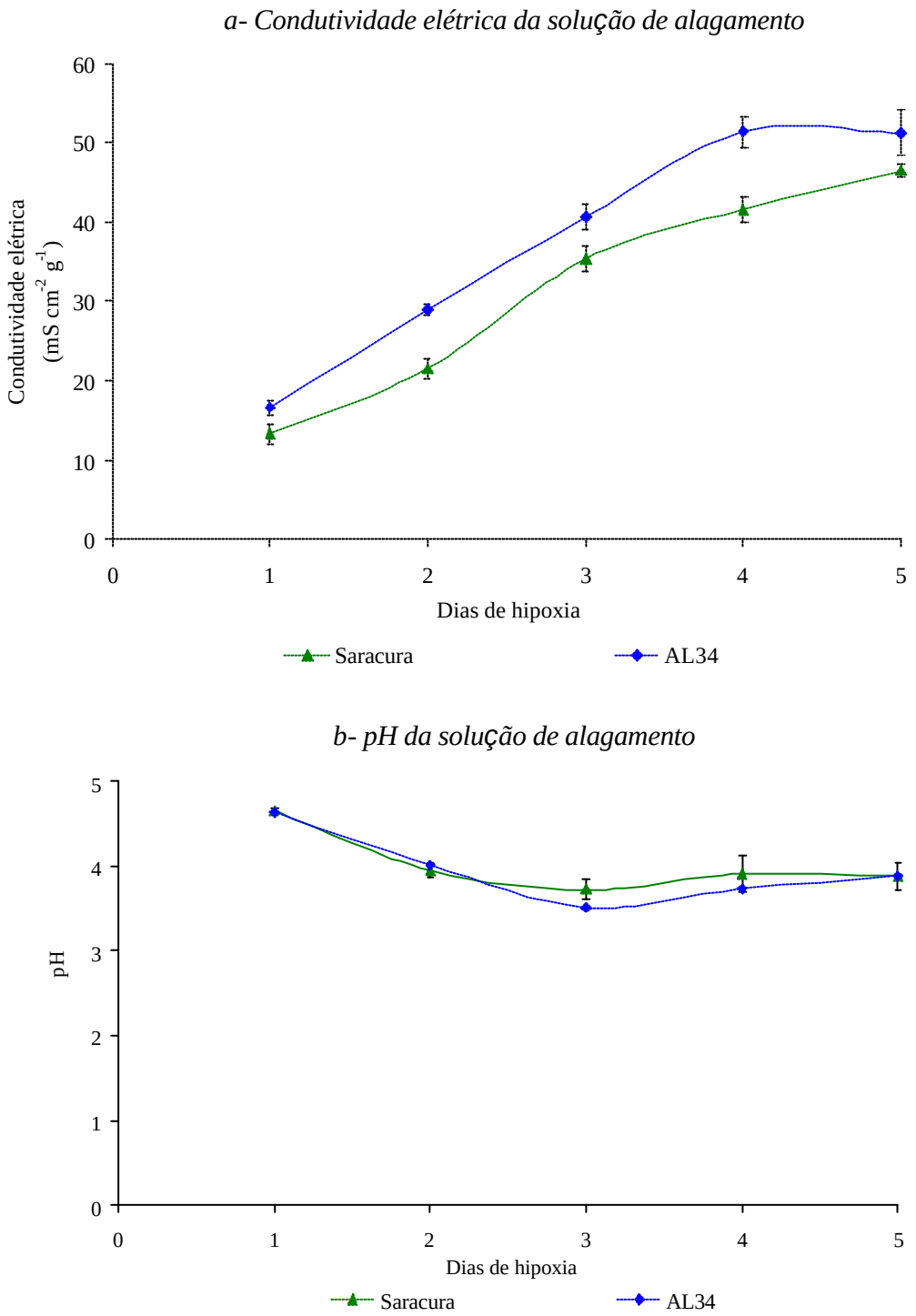



Figura 3. Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após a diferentes períodos de hipoxia (a) Condutividade elétrica da solução de alagamento; (b) pH da solução de alagamento.

Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

A diminuição do **pH** da solução de alagamentoindica tanto a lixiviação dos solutos pelas membranas celulares como a grande excreção de cátions hidrogênio ($H^+$) para a solução de alagamento, sendo que as duas cultivares estudadas tiveram resposta semelante (Figura 3b). Vitorino (1999) observou o mesmo resultado em plântulas de milho cv. Saracura e BR 107, submetidas a até 6 dias de hipoxia.

Drew (1997) verificou que, em milho sob condições de deficiência de oxigênio, ocorre um desvio da respiração aeróbica para as rotas fermentativas produzindo lactato e $H^+$. A maioria do lactato produzido foi encontrada no meio de cultivo, sugerindo um mecanismo muito eficiente de eliminação desse produto tóxico para o meio externo. Além do lactato, um dos fatores limitantes para a sobrevivência das plantas sob deficiência de oxigênio no meio é a acidificação do citoplasma. Neste caso, a diminuição dos valores de pH com o aumento do tempo de hipoxia, pode estar relacionado a um mecanismo de regulação que impede que o pH citoplasmático atinja um nível letal para a célula.

As plântulas das cultivares estudadas, submetidas a apenas um dia de hipoxia, quando comparadas com o controle, apresentaram aumento de, aproximadamente, 25% no **peso da matéria fresca (PMF)**, medida após 4 dias de germinação (Figura 4a), caindo após o terceiro dia de alagamento para a cv. Saracura e após o primeiro para a cv. AL34. O **peso de matéria seca (PMS)** das plântulas manteve, aproximadamente os mesmos valores nas plântulas testemunhas e naquelas submetidas a hipoxia, para ambas as cultivares (Figura 4b). O PMS das plântulas de Saracura submetidas ao alagamento, manteve-se maior que o das plântulas controle. A cv. AL34, no entanto, não apresentou a mesmo resposta, indicando mais uma vez que sua resposta ao alagamento é pior que a da cultivar Saracura.

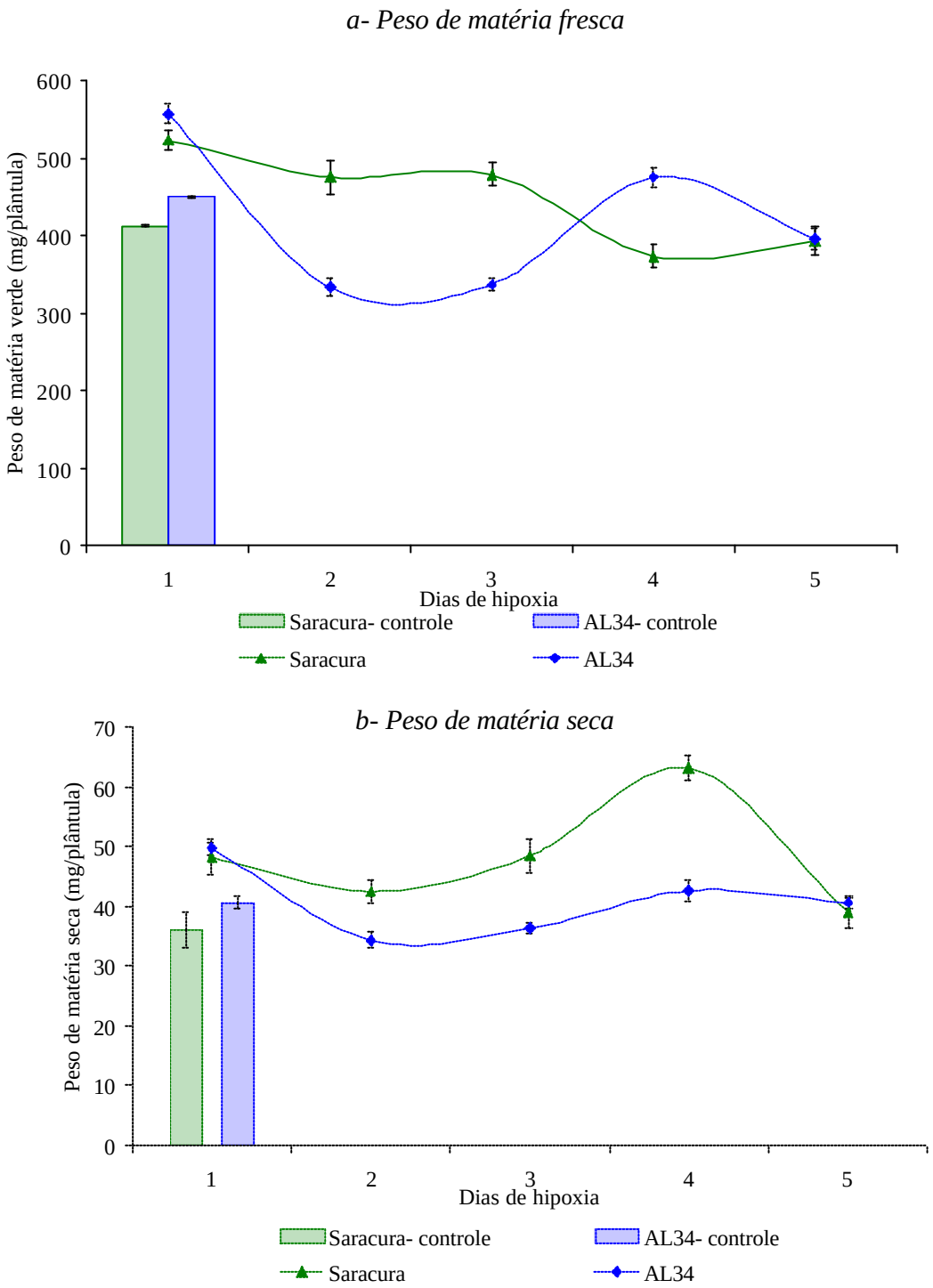



Figura 4. Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após a diferentes períodos de hipoxia (a) Peso de matéria fresca após 4 das de germinação; (b) Peso de matéria seca após 4 dias de germinação. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

O **índice de velocidade de emergência** (IVE) foi maior para as sementes da cultivar AL34, mostrando que, apesar de ter ocorrido o contrário no laboratório, o desempenho desta em campo foi ligeiramente melhor que o da cultivar Saracura.(Figura 5a), no entanto, o **tempo médio de emergência** (TME), não diferenciou as duas cultivares (Figura 5b). O tempo de alagamento não provocou diferença no IVE e TME das sementes, no entanto as sementes controle que não estavam embebidas demoraram aproximadamente um dia a mais para germinar (Figura 5).

As **curvas de emergência** em campo não foram significativamente diferentes entre os períodos de alagamento, no entanto, comparando as testemunhas com as sementes submetidas ao alagamento, estas já estavam embebidas quando semeadas em campo. Devido a esse fato, o inicio da emergências dessas sementes ocorreu no quarto dia após a semeadura, enquanto a emergência das sementes testemunhas iniciou apenas no sexto dia após a semeadura (Figura 6 a-f). A cv Saracura mostrou maior número de plântulas normais emergidas em campo para todos os tratamentos (Figura 6a-f).

A germinação é o processo de retomada do crescimento do eixo embrionário que consiste da seqüência ordenada de atividades metabólicas, que iniciam-se com a embebição das sementes em água, por outro lado, o excesso de umidade, em geral, provoca decréscimo na germinação em sementes sensíveis a essa condição, visto que impede a penetração do oxigênio e reduz todo o processo metabólico (A semente..., 2002). As sementes submetidas ao alagamento embeberam mais rapidamente que as testemunhas sem, no entanto, diminuir sua velocidade de germinação, demonstrando, mais uma vez que as sementes de ambas as cultivares estudadas são tolerantes à hipoxia.

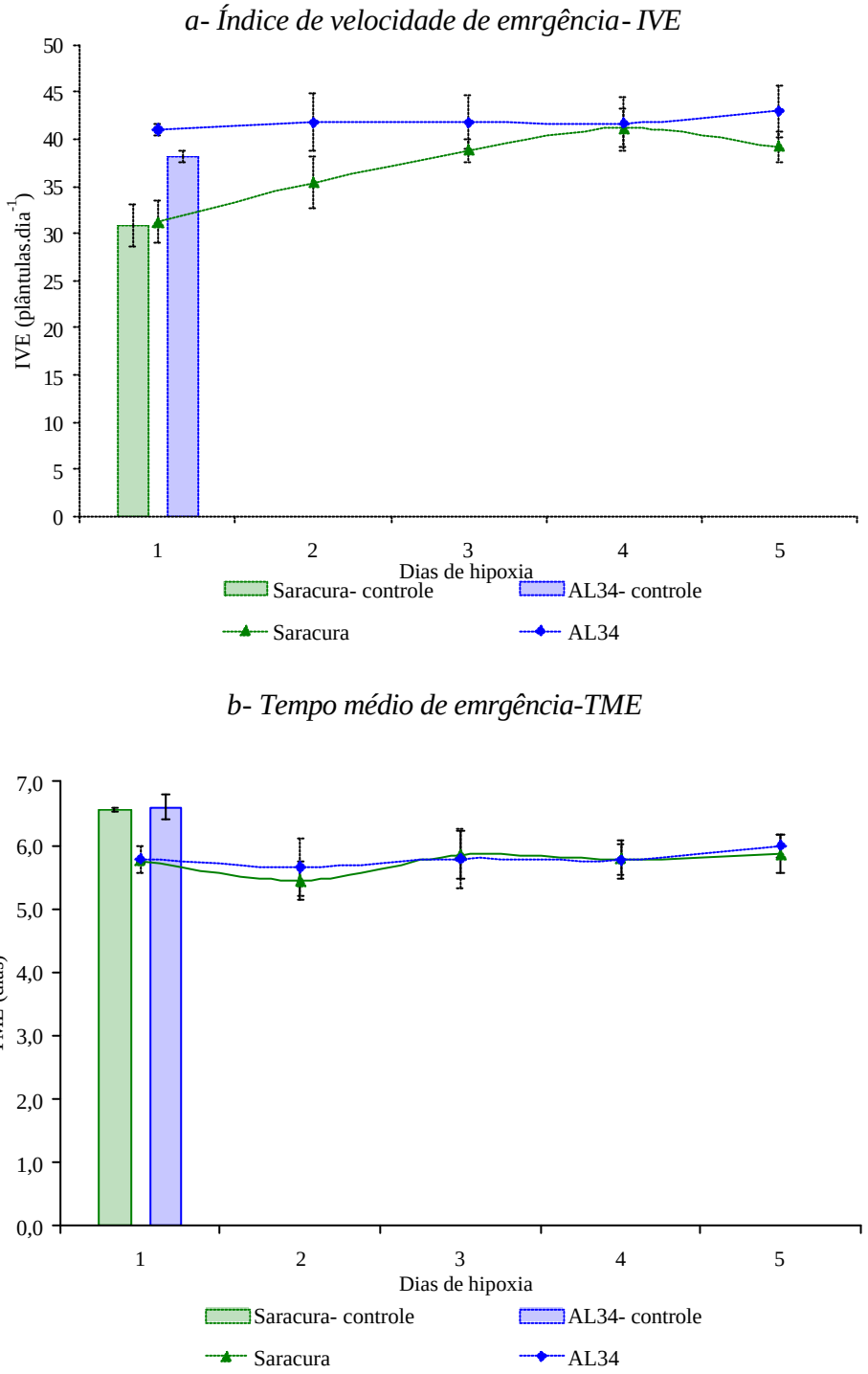



Figura 5. Vigor de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34 após a diferentes períodos de hipoxia (a) Índice de velocidade de emergência; (b) Tempo médio de emergência. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

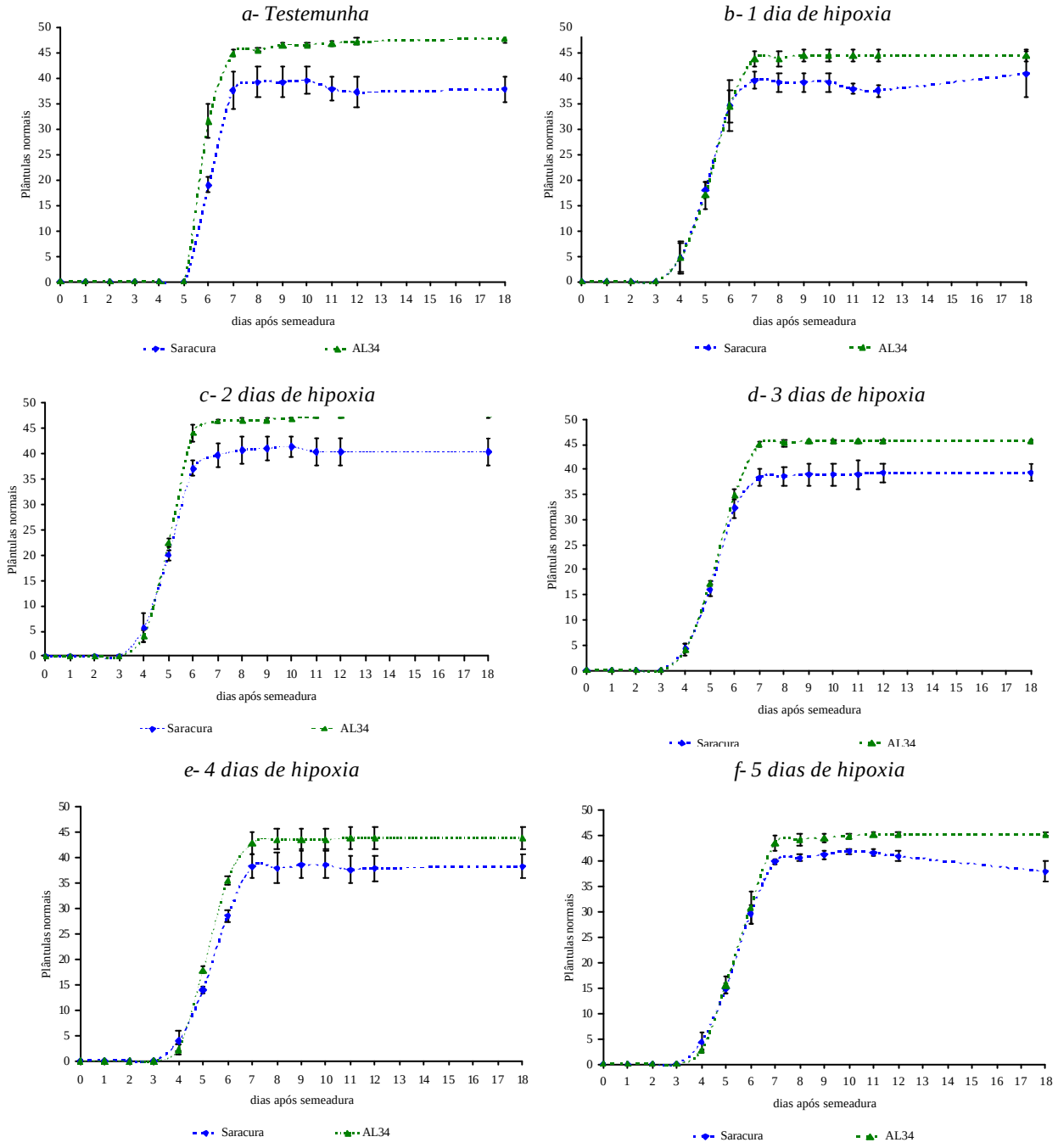



Figura 6. Emergência em campo de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34, cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia. (a) Sementes não submetidas à hipoxia; (b) Após 1 dia de hipoxia; (c) Após 2 dias de hipoxia; (d) Após 3 dias de hipoxia; (e) Após 4 dias de hipoxia; (f) Após 5 dias de hipoxia.
Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

O **crescimento da parte aérea** e o **crescimento da raiz principal** das sementes controle (não submetidas ao alagamento) foi reduzido com os tratamentos de $Ca^{2+}$ e $GA_3$ (Figuras 7 e 8). As plântulas, cujas sementes submetidas ao alagamento e germinadas em rolos de papel germitest, embebidos em água destilada, apresentaram crescimento menor a partir do primeiro e segundo dia de hipoxia para as cultivares AL34 e Saracura, respectivamente, não tendo diferença significativa entre as cultivares a partir do terceiro dia (Figuras 7a, 8a). Nos demais tratamentos também houve aumento do crescimento nos primeiros dias de hipoxia e diminuição após períodos mais prolongados, 4 e 5 dias, apresentando um comportamento semelhante ao teste de germinação (Figura 1). Em ambas as cultivares, os tratamentos com GA e $Ca^{2+}$ tiveram efeito negativo no crescimento das plântulas.

Na Figura 9, verifica-se que a razão entre a raiz e a parte aérea se manteve constante ao longo do período de alagamento em plântulas cujas sementes não receberam tratamento químico. Durante os tratamentos com GA e $Ca^{2+}$ houve uma diminuição da razão entre a raiz e a parte aérea das plântulas ao longo do período de alagamento. No quinto dia de hipoxia, houve uma diminuição de mais de 40% entre as plântulas da cv. Saracura cujas sementes germinaram em água destilada e as tratadas. Por outro lado não houve diferença entre os tratamentos. As sementes controle produziram plântulas com maior razão entre raiz e parte aérea que aquelas submetidas ao alagamento.

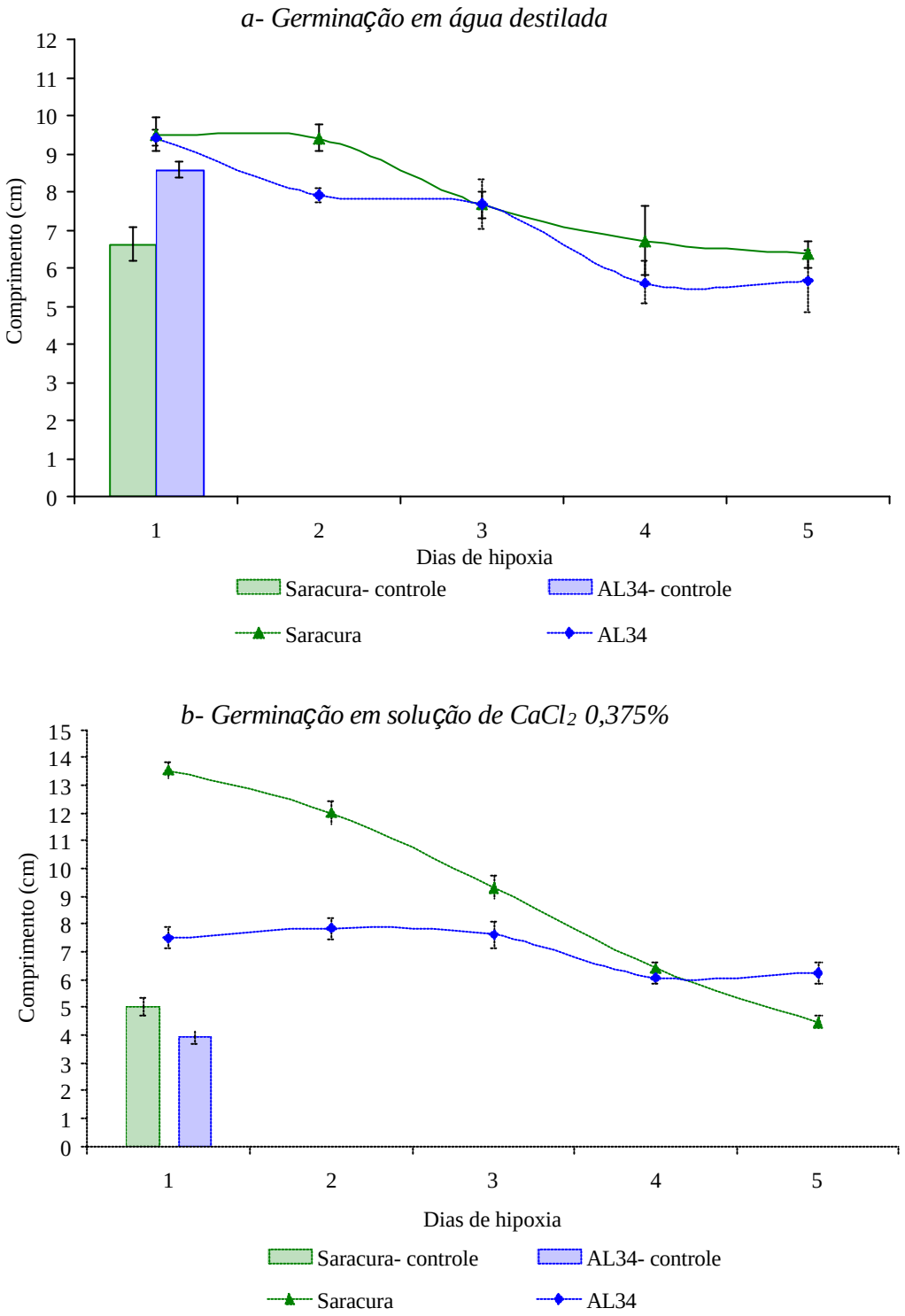
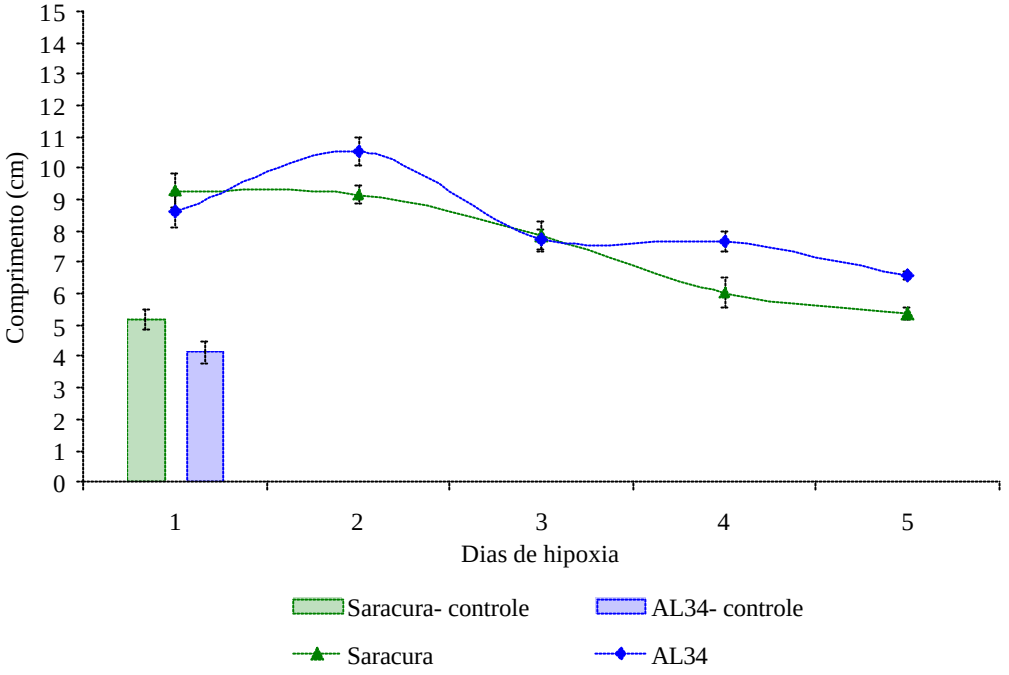



Figura 7. Crescimento da parte aérea de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

*c- Germinação em solução de $GA_3$ 100mg.$L^{-1}$*




*d- Germinação em solução de $CaCl_2$ 0,375% + $GA_3$ 100mg.$L^{-1}$*

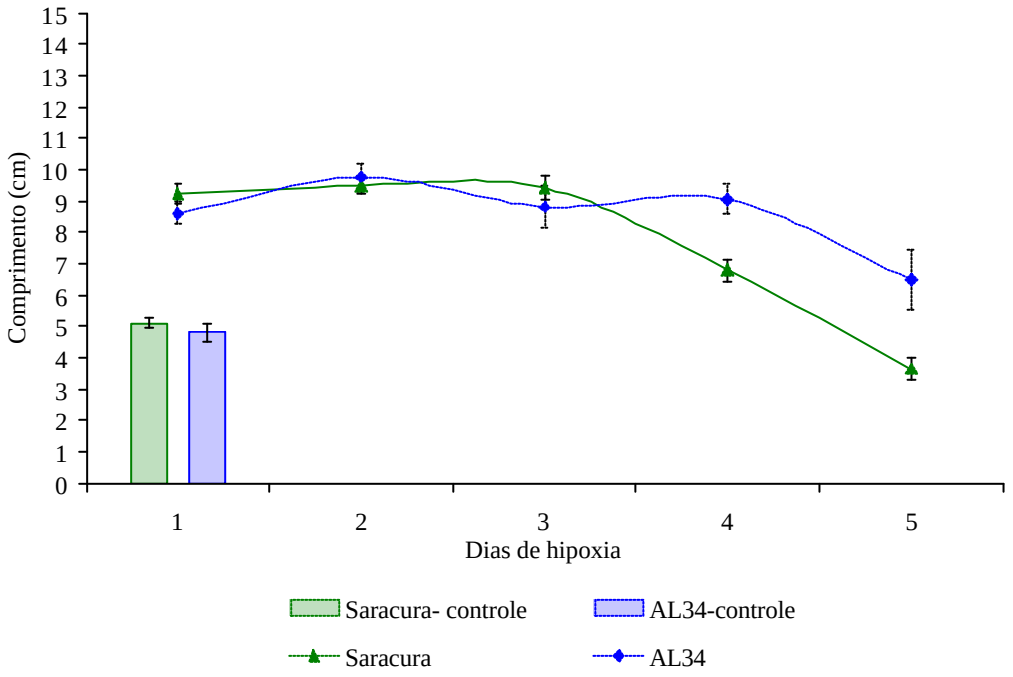



Figura 7. continuação...

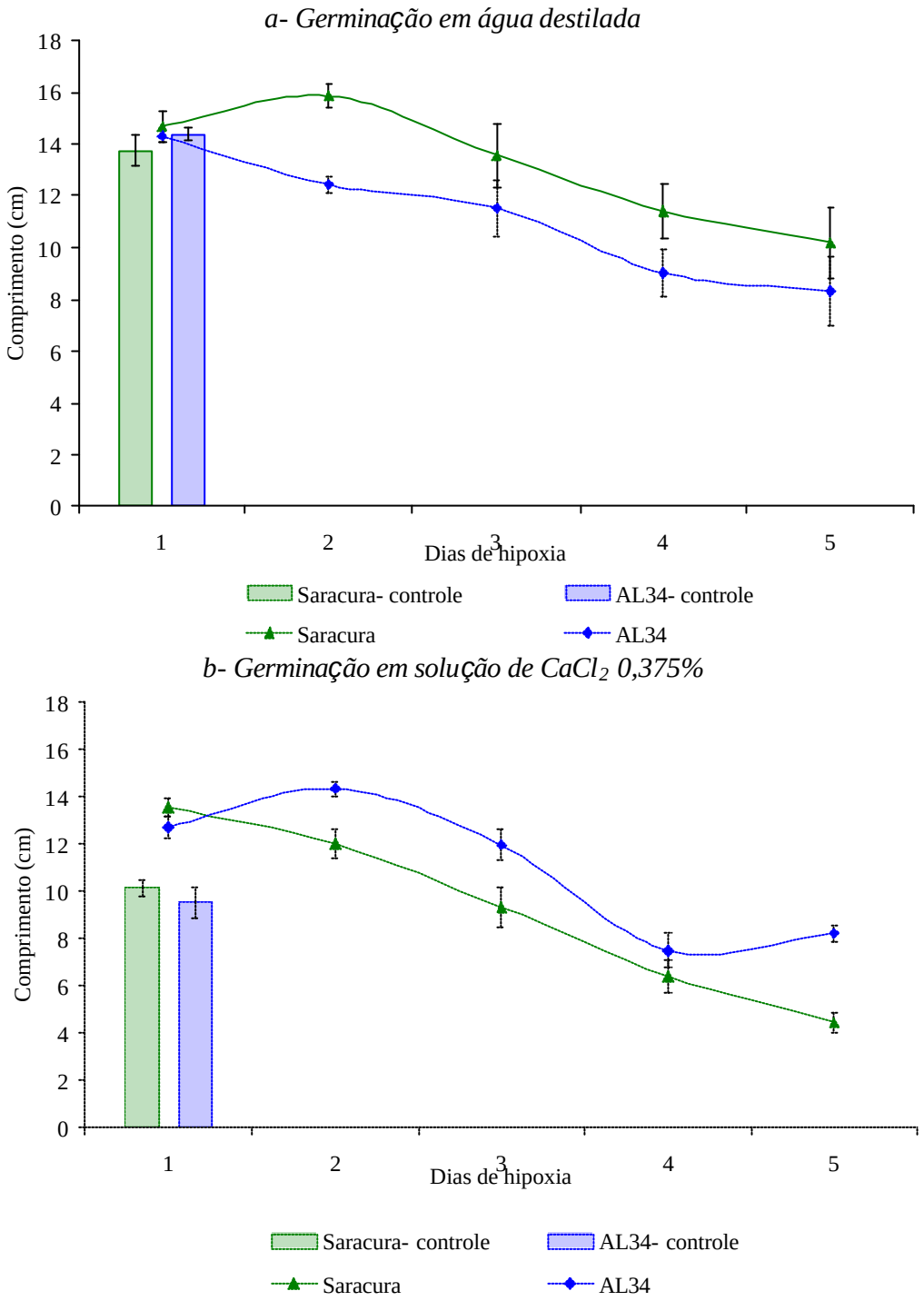
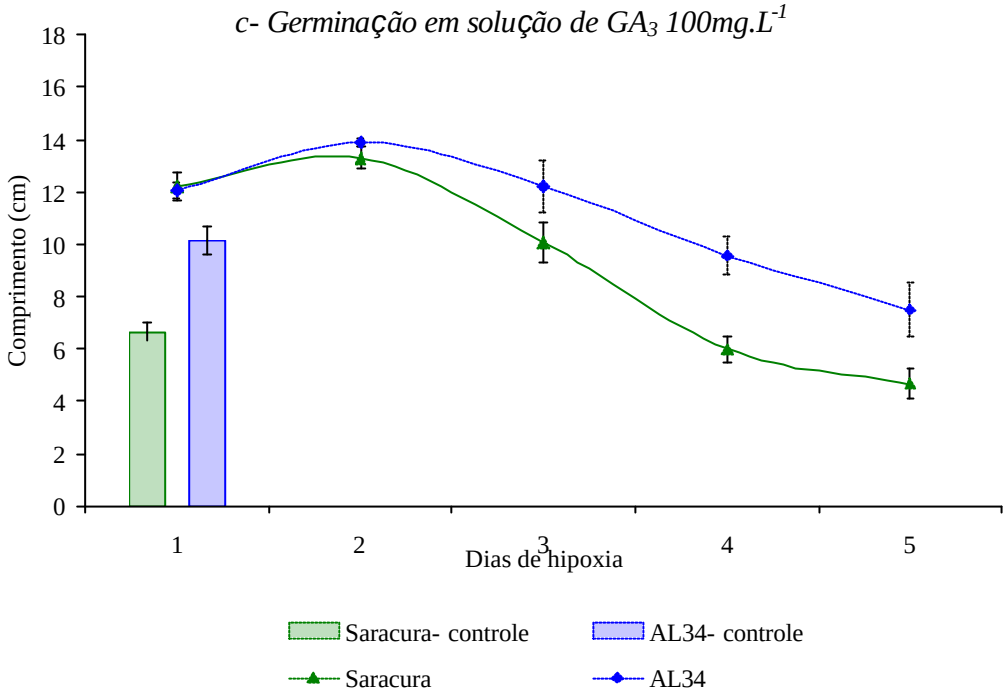



Figura 8. Crescimento da raiz principal de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



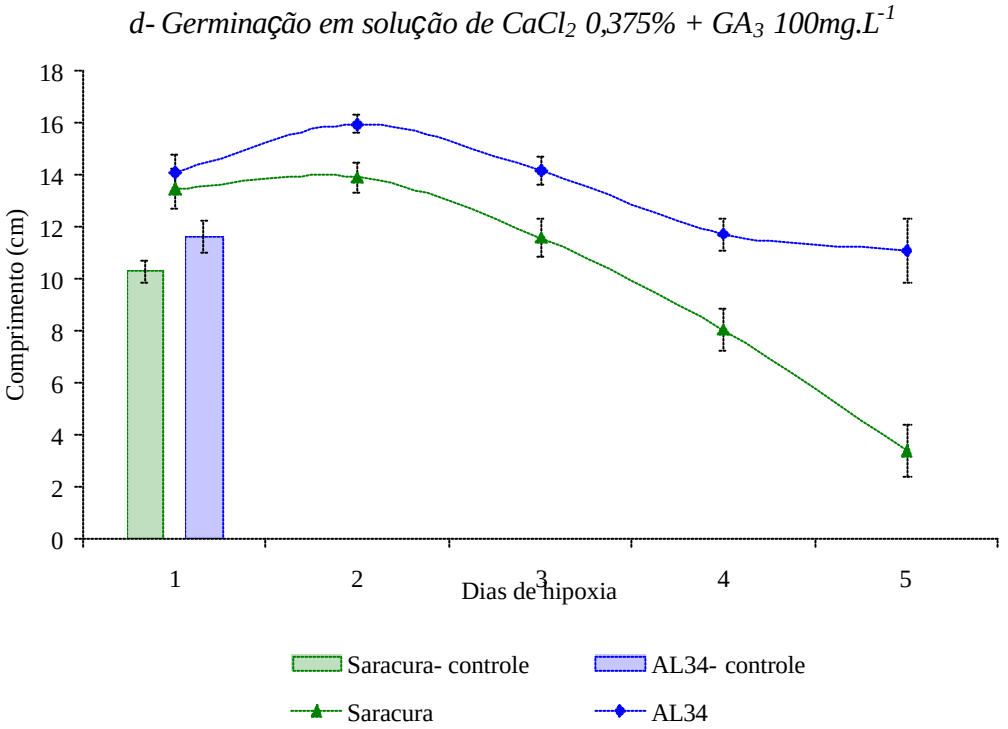




Figura 8. continuação...

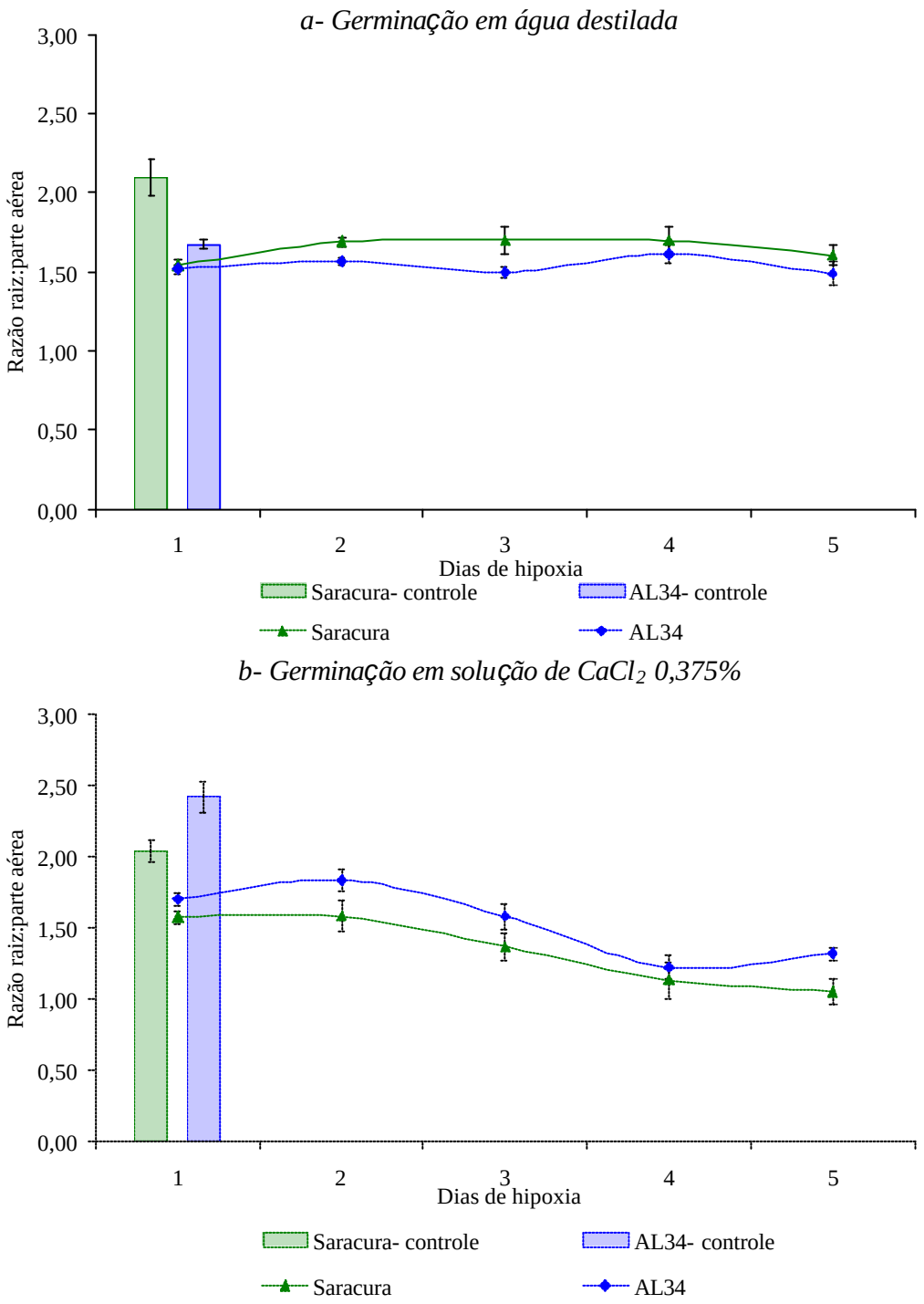
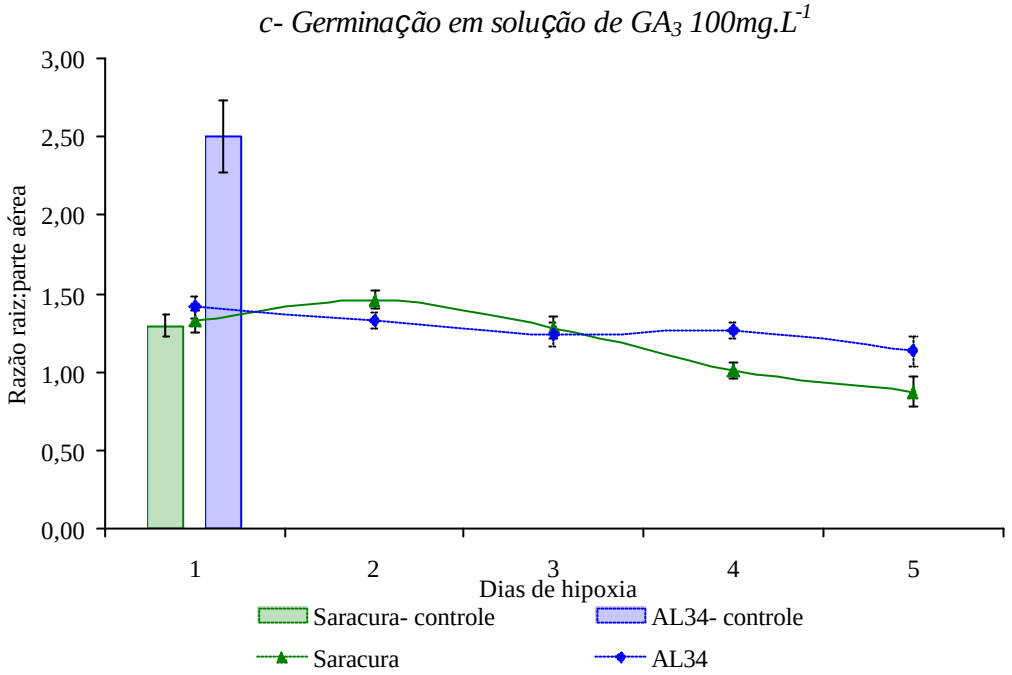



Figura 9. Razão entre parte aérea e raiz principal de plântulas de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia. Tratamentos controle indicam que as sementes não foram submetidas à hiopoxia. Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



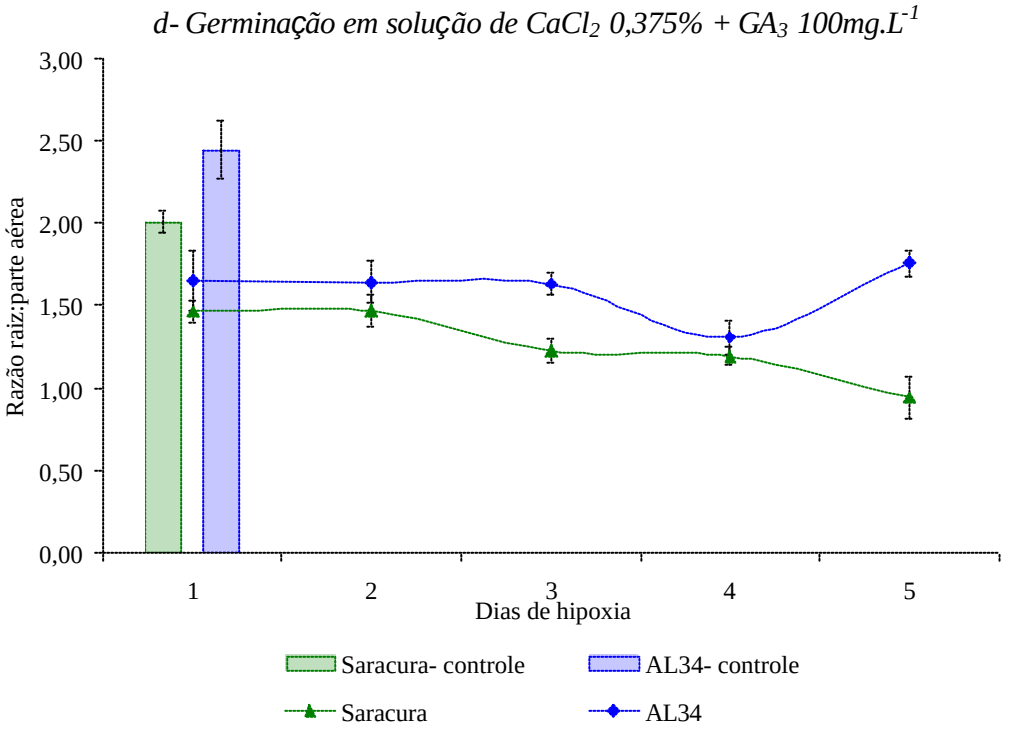




Figura 9. continuação...

Trabalhos realizados na caracterização da tolerância da cv. Saracura demonstraram que a germinação das cariopses em solução de $CaCl_2$ aumentou a sobrevivência das plântulas quando submetidas ao alagamento (Vitorino, 1999). Posteriormente foi verificado que as plântulas originadas nessas condições apresentam o crescimento reduzido de forma marcante quando comparadas com as plântulas obtidas de germinação somente em água (Gouvêa, 2001).

O $Ca^{2+}$, é um nutriente conhecido por atuar na permeabilidade, seletividade das membranas e na regulação da pressão de turgor das células (Hoffmam e Besson, 1998). Uma possível explicação para os resultados encontrados quando a germinação se deu em solução de $CaCl_2$ é a menor taxa de embebição de água pelas sementes ao efeito osmótico do sal. Neste caso, o crescimento das raízes diminui com o aumento na pressão osmótica da solução de germinação. Além deste fator, ocorre o efeito do cálcio como um elemento estrutural de parede celular. Existem registros na literatura que relatam a importância da bivalência desse nutriente por formar ligações covalentes com cargas negativas de ácidos poligalacturônicos da pectina impedindo a expansão celular (Marschner, 1998) .

## 6.2 Degradação de amido durante a germinação

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 quantidade de amido degradado é menor resultando em valores menores nos ensaios realizados. Nas duas cultivares estudadas, a atividade de α-amilase e de amilases totais aumenta até o sétimo dia de germinação em

condições normais de oxigênio (Figura 10). A atividade das amilases totais, que são a α-amilase, β-amilase, enzimas desramificadoras e α-glucosidase, têm um ritmo de crescimento mais acelerado que a atividade de α-amilase. Isso ocorre porque as amilases totais, além de serem sintetizadas, algumas dessas enzimas, são *preexistentes* nas sementes e são ativadas durante a germinação das sementes (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985).

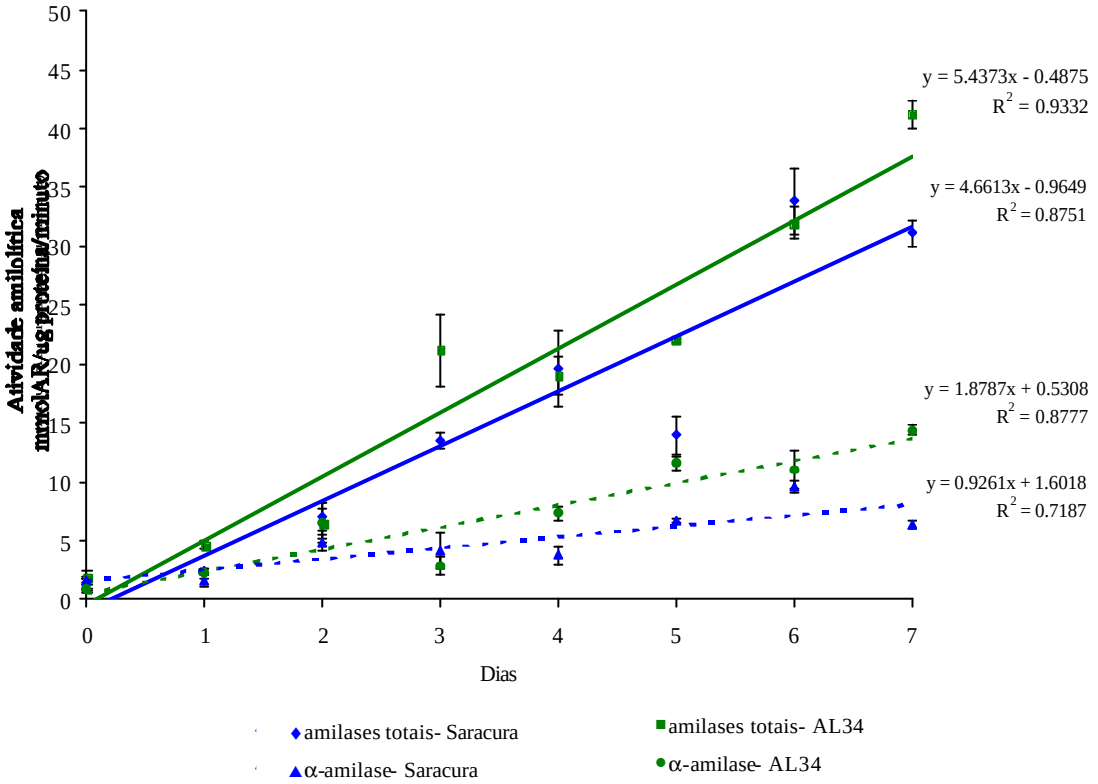



Figura 10. Atividade amilolítica durante a germinação de sementes de milho das cultivares Saracura- BR 154 e CATI- AL34.

Perata et al. (1997) relataram que a indução de α-amilase em condições alagadas só foi verificada em sementes de arroz. Essas sementes sem embriões respondem ao GA, produzindo mRNA para α-amilase mesmo em condições anóxicas. Os mesmos autores verificaram, também, que sementes de outros cereais, como cevada e trigo,

não acumulam mRNA para α-amilase quando em anaerobiose, devido à inibição da transcrição dos genes de α-amilase (Perata et al., 1993).

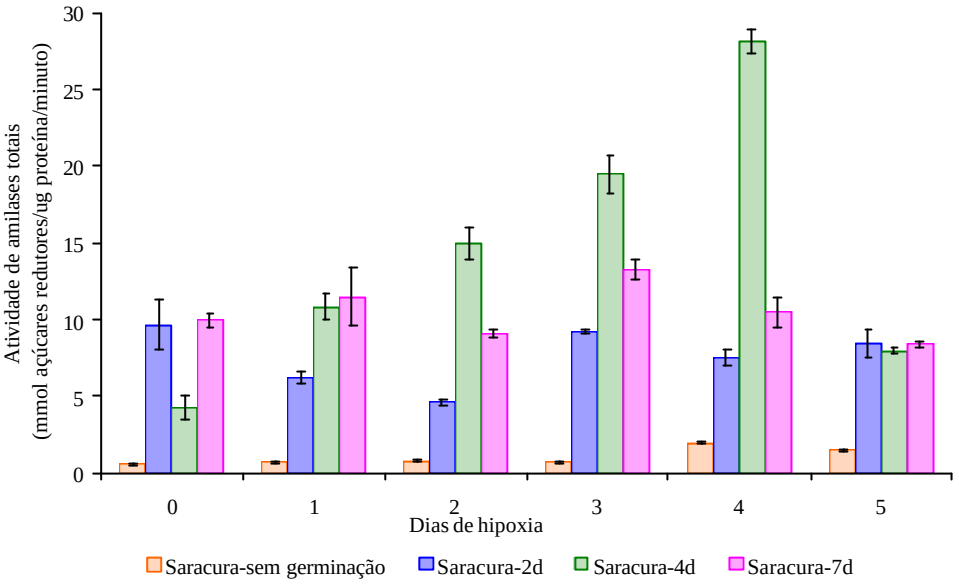
Perata et al.(1986) observaram que o etanol liberado durante a fermentação alcoólica, que ocorre em condições de deficiência de oxigênio no meio, é um grande inibidor da atividade de amilases. Conforme indicado nas figuras 11 e 12, a atividade de amilases totais e de α-amilase, logo após a submersão, é muito baixa, não havendo diferença significativa entre os períodos de alagamento. Esse fato pode ter ocorrido devido à inibição da transcrição dos genes de α-amilase e inibição da atividade das amilases *preexitentes* nas sementes de milho estudadas.

Padrão de ativação das amilases totais e indução da síntese de α-amilase e, conseqüentemente, o pico de atividade para as enzimas ocorre de maneira distinta para as duas cultivares estudadas. As sementes de Saracura submetidas ao alagamento apresentaram um pico de atividade amilolítica aos quatro dias de germinação após os tratamentos de 2, 3 e 4 dias de alagamento (Figuras 11a e 12a). As sementes de AL34 submetidas ao alagamento, apresentaram rápida ativação de amilases totais, após 2 dias de germinação o endospermas dessas sementes apresentavam alta atividade amilolítica. No entanto, a partir disto a atividade amilolítica caiu gradativamente ( Figura 11b). Nesta cultivar a α-amilase foi induzida tardiamente, somente após 7 dias de germinação (Figura 12b). Esse fato pode ter influenciado na tolerância das cultivares ao alagamento, a coordenação entre a ativação das amilases totais e a indução da síntese de α-amilase na cultivar Saracura pode ter contribuído para a sua maior tolerância a esse estresse.

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 (Groat & Briggs, 1969, citados Ashford & Gubler, 1984; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1985). Em condições hipóxicas, devido à deficiência de oxigênio ou ao acúmulo de substâncias tóxicas como etanol e acetaldeído (Martin et al.,1991) a atividade de α-amilase na cultivar AL34 demorou mais para que a cultivar Saracura para alcançar o pico de degradação de amido, indicado pela atividade de α-amilase no endosperma (Figura 12), o que provavelmente inibiu o PMF, PMS e o crescimento da raiz principal e da parte aérea de forma mais severa na cv. AL34 que na cv. Sacarura (Figuras 4, 7a e 8a).

Os tratamentos $Ca^{2+}$, $GA_3$ e $Ca^{2+}$+$GA_3$ tiveram efeitos diferentes conforme a cultivar, a fase de germinação e as enzimas. As sementes de Saracura na primeira etapa da germinação (2 dias de germinação após o alagamento) apresentaram aumento da atividade amilolítica anos tratamentos que apresentavam $CaCl_2$ até o terceiro dia de hipoxia. O tratamento de germinação em solução de $GA_3$, não surtiu efeito nas sementes de Saracura. (Figuras 13a e 14 a).Nesta mesma fase, a cv. AL34 apenas respondeu aos tratamentos com $GA_3$ aumentando sua atividade amilolítica após 2 dias de alagamento (Figuras 13b e 14b). Esse fato se reflete na primeira contagem da germinação, em que as sementes de Saracura e AL34 germinaram mais rapidamente nos tratamentos com $CaCl_2$ e $GA_3$, respectivamente (Figura 2).Na segunda fase (4 dias de germinação) a atividade amilolítica de ambas as cultivares foi maior na tratamento com $CaCl_2$, em todos os períodos de alagamento, bem como nas sementes que não sofreram alagamento (Figuras 13c-d e 14c-d), indicando o efeito do $Ca^{2+}$ como ativador enzimático.



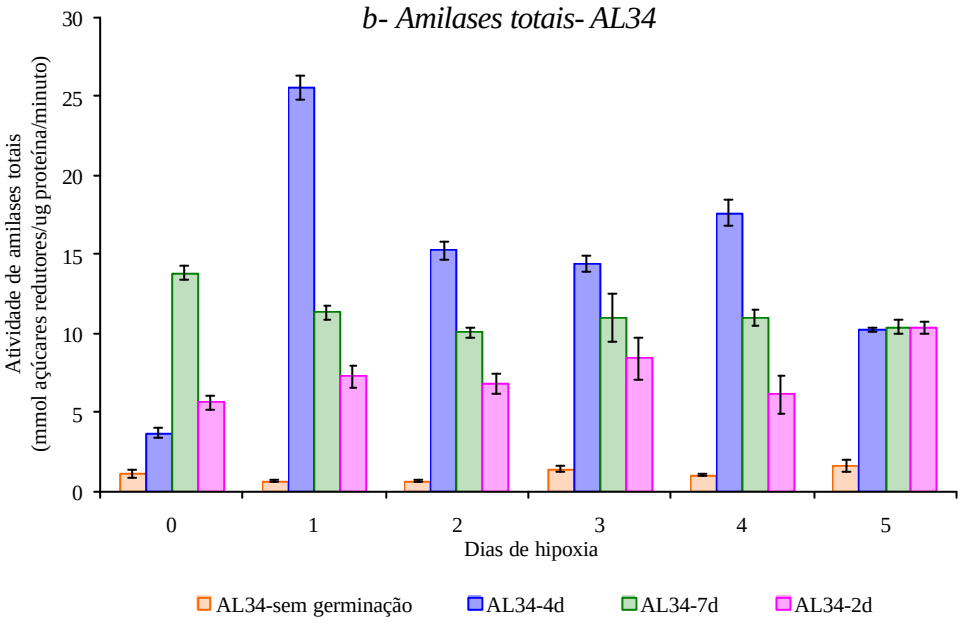
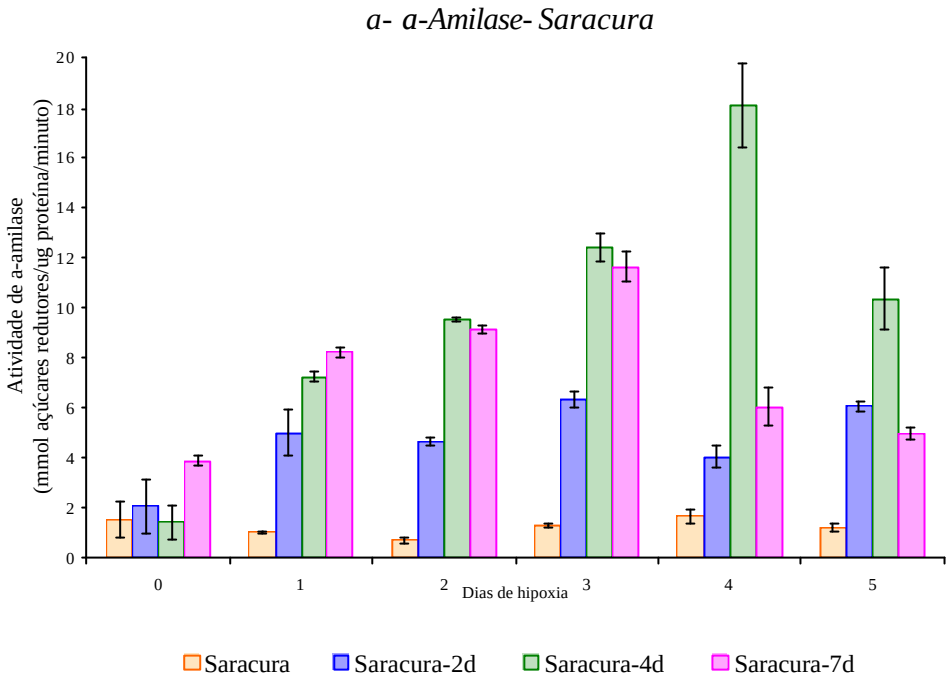




Figura 11. Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.
Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



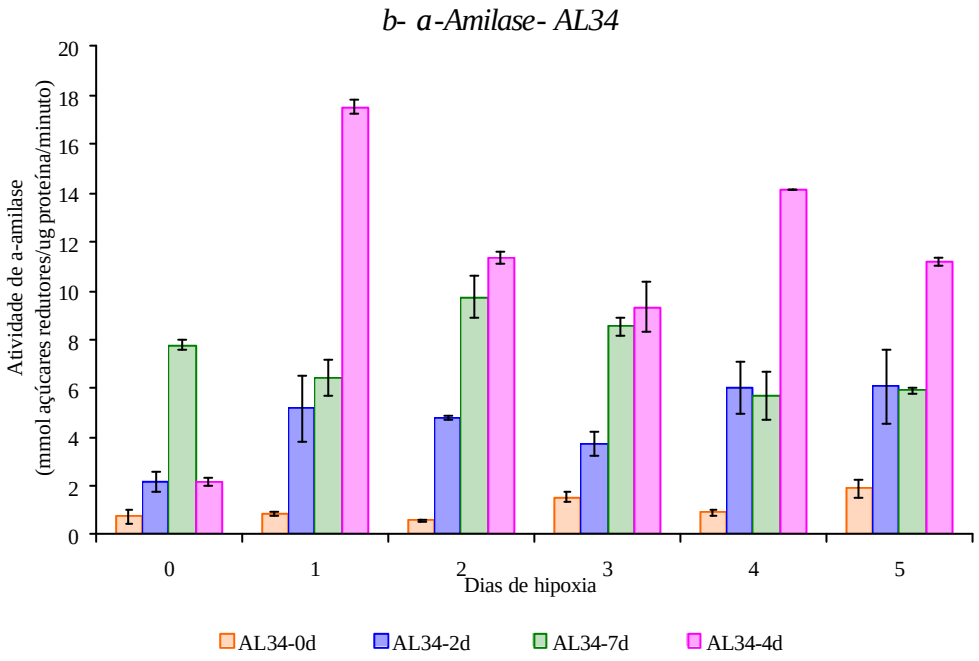




Figura 12. Atividade de α-amilase de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia.
Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

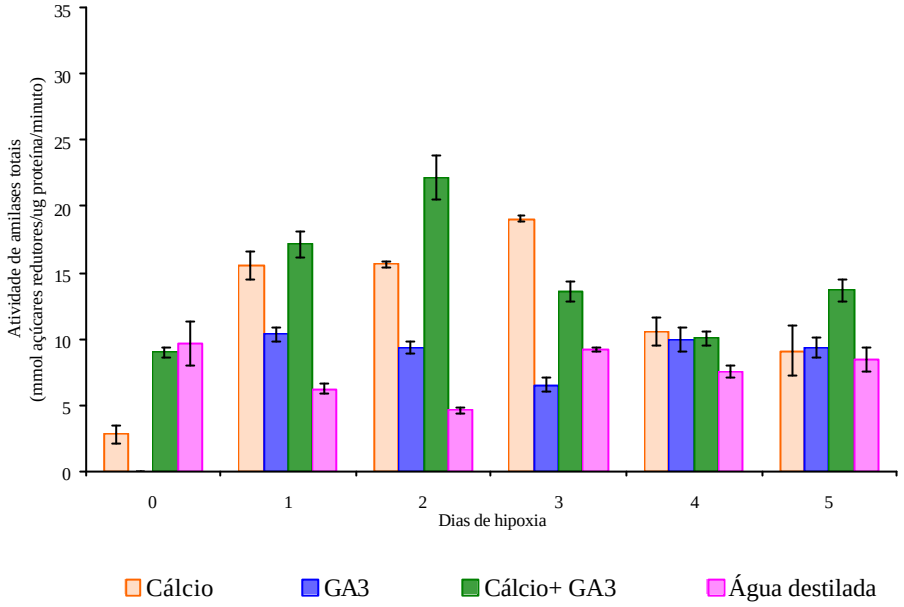
O tratamento que se destacou na terceira fase foi o de $Ca^{2+}$+$GA_3$ induzindo um aumento na atividade de α-amilase de amilases totais nas cultivares Saracura e AL34 (Figuras 13e-f e 14e-f).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam maior tolerância das sementes da cultivar Saracura ao alagamento em relação à cultivar AL34, sugerido nos dados de qualidade fisiológica da semente (germinação, primeira contagem, condutividade elétrica e crescimento de plântulas). Segundo Perata et al. (1992), capacidade de tolerar condições alagadas tem alta correlação com a degradação das reservas de amido e à disponibilidade de açúcares prontamente utilizados no metabolismo energético. Os dados referentes à atividade amilolítica das sementes cv. Saracura e cv. AL34, por apresentarem a mesma tendência que os de qualidade fisiológica, indicam que a tolerância pode estar diretamente ligada a uma maior atividade de α-amilase e amilases totais.

A solução de 0,375% de $CaCl_2$, manteve a alta germinação das sementes de Saracura e AL34, aumentou o número de plântulas normais na primeira contagem do teste de germinação e aumentou a atividade amilolítica até o quarto dia de germinação, no entanto, essa solução inibiu o crescimento das plântulas. Da mesma forma, Purcino (2001) verificou que a adição de $CaCl_2$ no papel de germinação teve um efeito significativo na redução do comprimento de raiz e parte aérea.

A germinação das sementes depende da ação do $GA_3$ em várias funções, como a ativação do crescimento vegetativo do embrião; o enfraquecimento do endosperma quando este impede o crescimento do embrião e a mobilização das reservas armazenadas no endosperma (Taiz e Zeiger, 1998).

*a- Amilases totais- Saracura- 2 dias de germinação*




*b- Amilases totais- AL34- 2 dias de germinação*

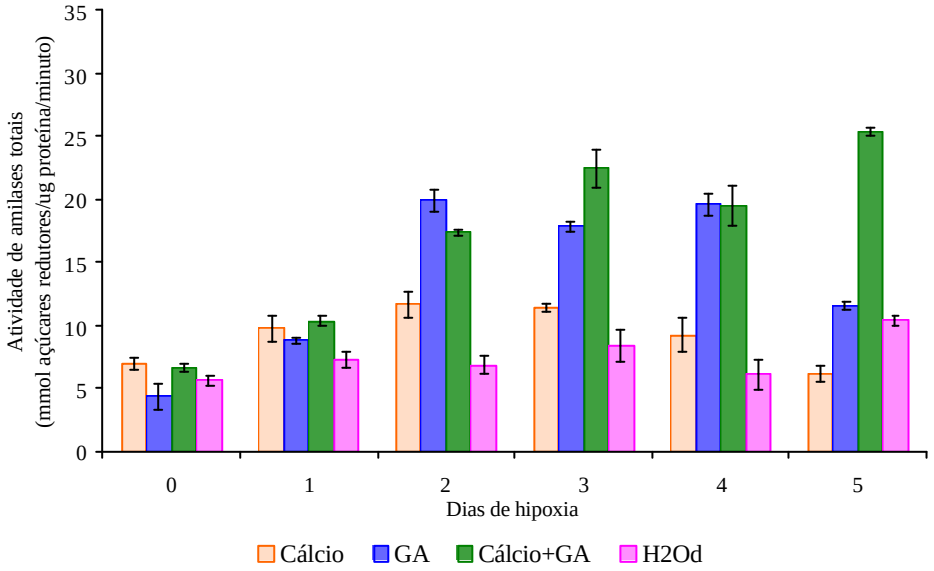
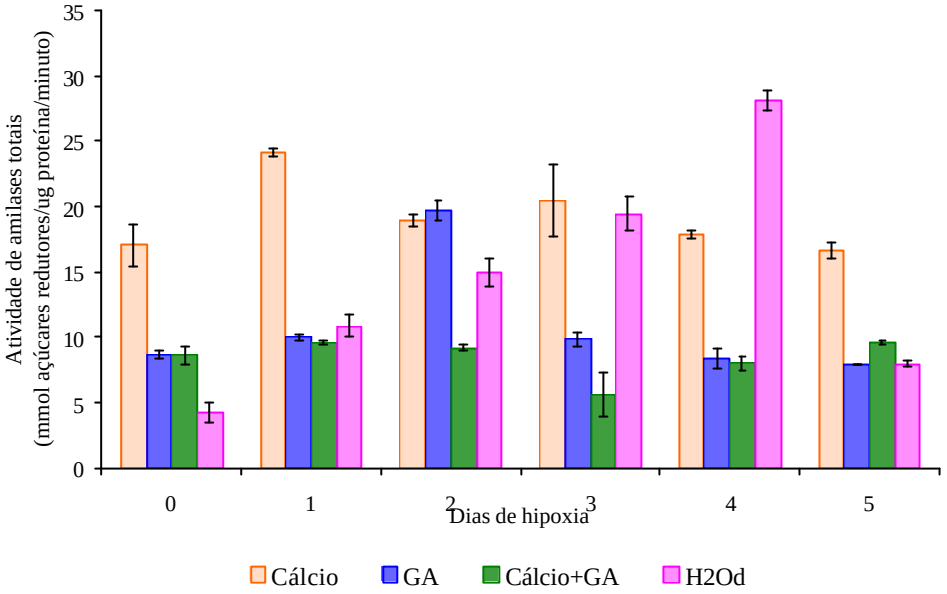



Figura 13. Atividade de amilases totais de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia e germinadas em soluções de 0,375%$CaCl_2$ (=Cálcio;); 100mg.$L^{-1}$GA; 0,375% $CaCl_2$ +100mg.$L^{-1}$GA (=Cálcio + GA) e água destilada (=$H_2O$d)

Barras verticais significam o erro padrão de cada média.

*c- Amilases totais- Saracura- 4 dias de germinação*




*d- Amilases totais- AL34- 4 dias de germinação*

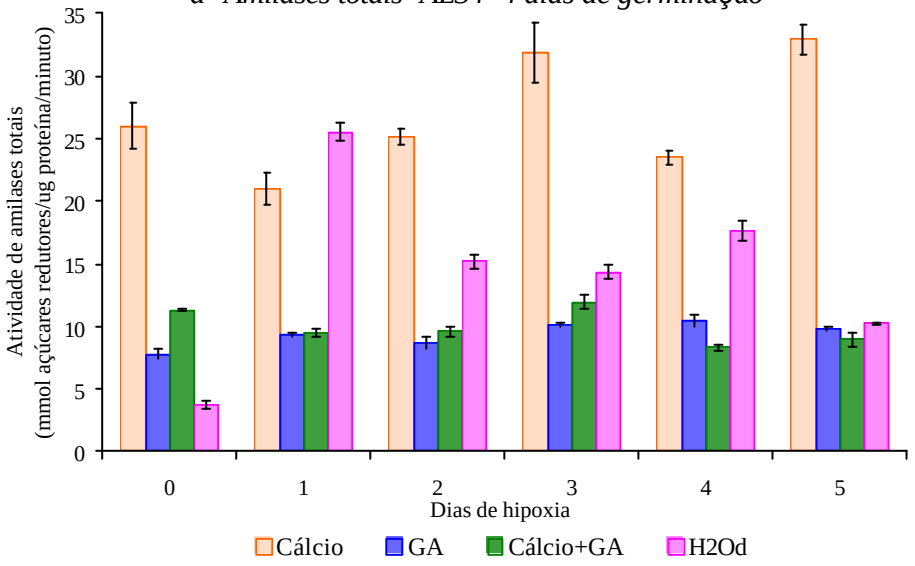
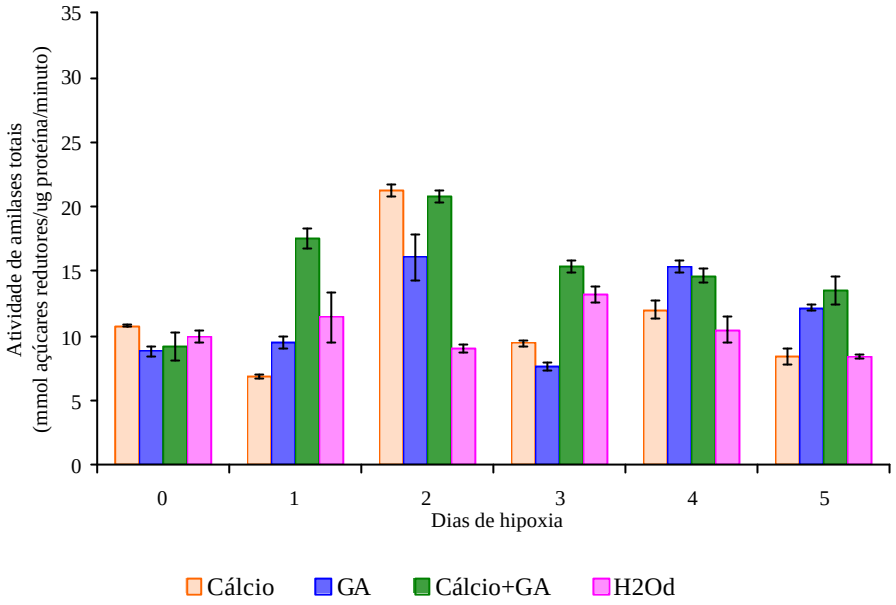



Figura 13.continuação...

*e- Amilases totais- Saracura- 7 dias de germinação*




*f- Amilases totais- AL34- 7 dias de germinação*

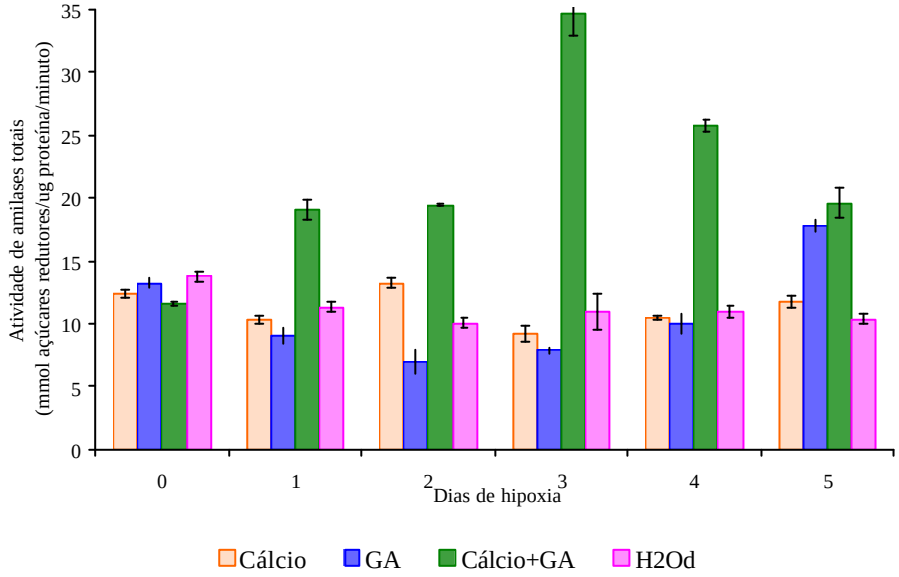



Figura 13.continuação...

Até o segundo dia de germinação, o $GA_3$ proporcionou um efeito positivo, tanto na qualidade fisiológica das sementes, como na atividade amilolítica no endosperma, principalmente em sementes submetidas a menores períodos de hipoxia. No entanto, ao se prolongar o tempo de alagamento e o período durante a germinação em contato com esse biorregulador houve queda brusca na qualidade fisiológica e na atividade de amilases das sementes tratadas, indicando possível efeito fitotoxico do ácido.

Bush et al. (1990) relatam que, em muitos cereais, a resposta das sementes ao ácido giberélico é dependente do cálcio, que atua como mensageiro secundário em uma via de transdução dos sinais provocados pelo $GA_3$ que levam à síntese e ao acúmulo da enzima α-amilase Ao combinar o $Ca^{2+}$ e o $GA_3$ na solução de embebição do papel germitest, as sementes apresentaram germinação e primeira contagem mais altas, indicando um sinergismo devido à integração entre o biorregulador e o mensageiro secundário aplicados exógenamente.

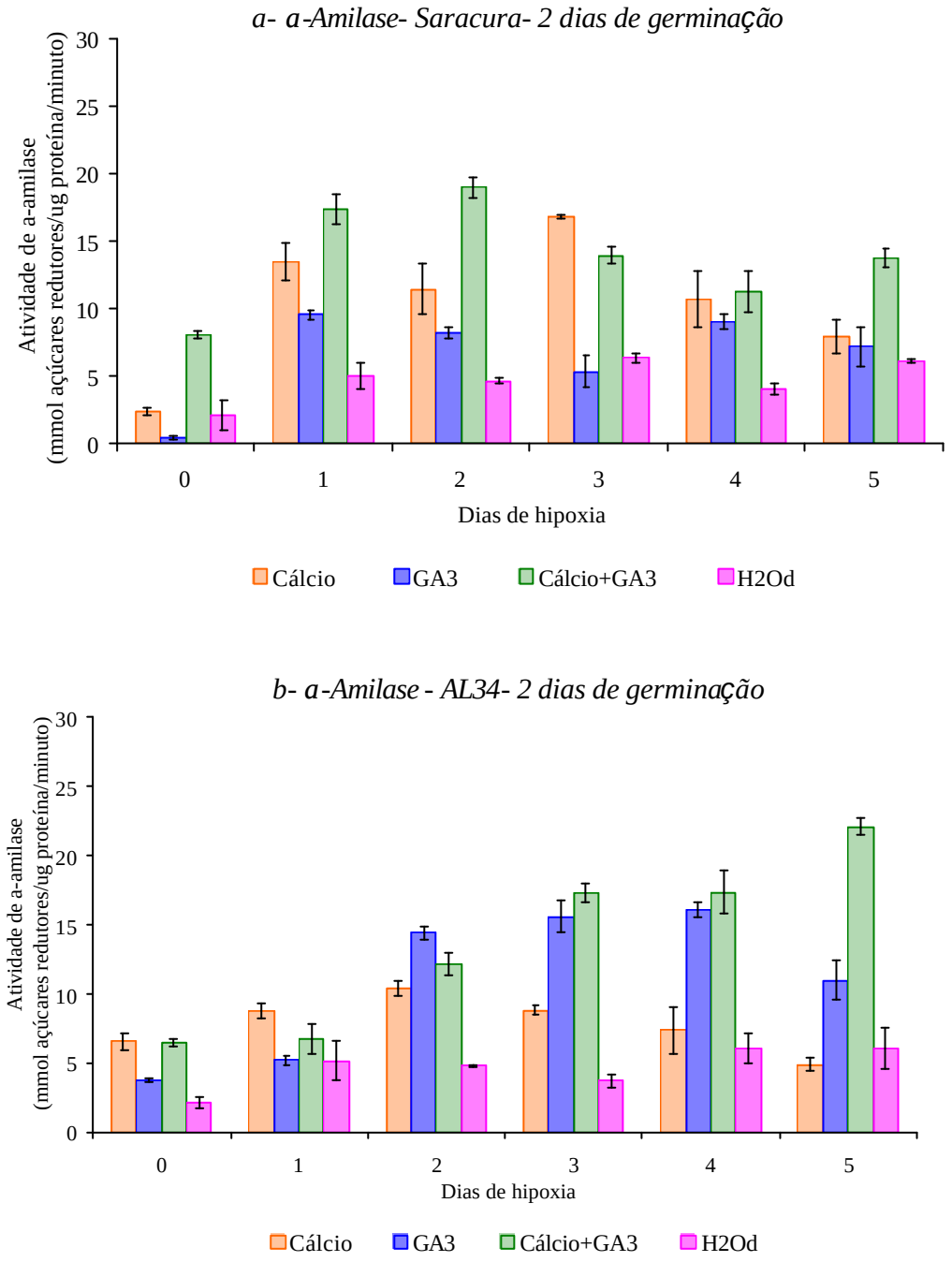
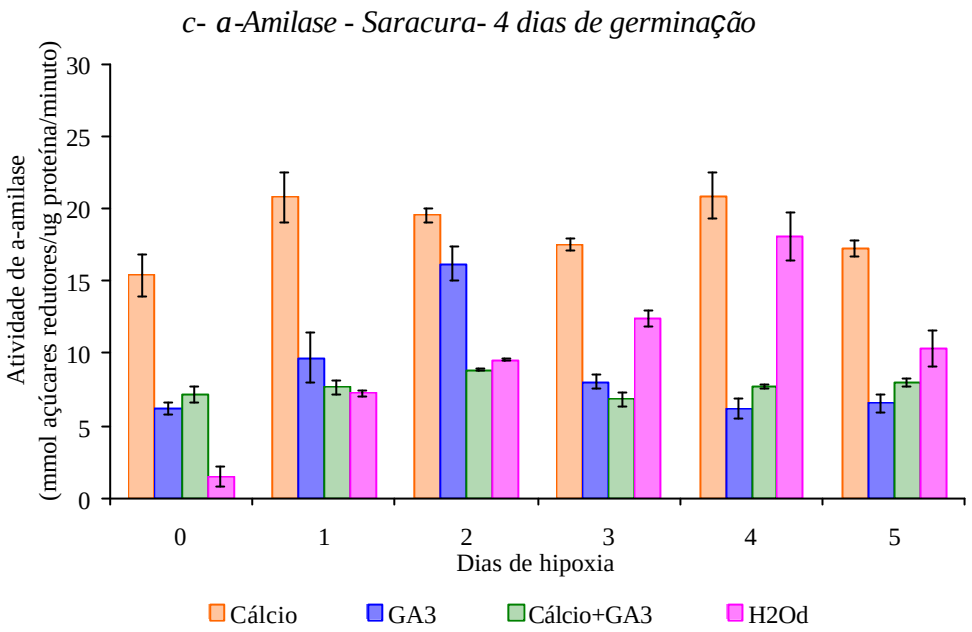



Figura 14. Atividade de α-amilase de sementes de milho cv. BRS1454-Saracura e CATI-AL34,cujas sementes foram submetidas a diferentes períodos de hipoxia e germinadas em soluções de 0,375%$CaCl_2$ (=Cálcio;); 100mg.$L^{-1}GA_3$; 0,375% $CaCl_2$ +100mg.$L^{-1}GA_3$ (=Cálcio + GA) e água destilada (=$H_2Od$)

Barras verticais significam o erro padrão de cada média.



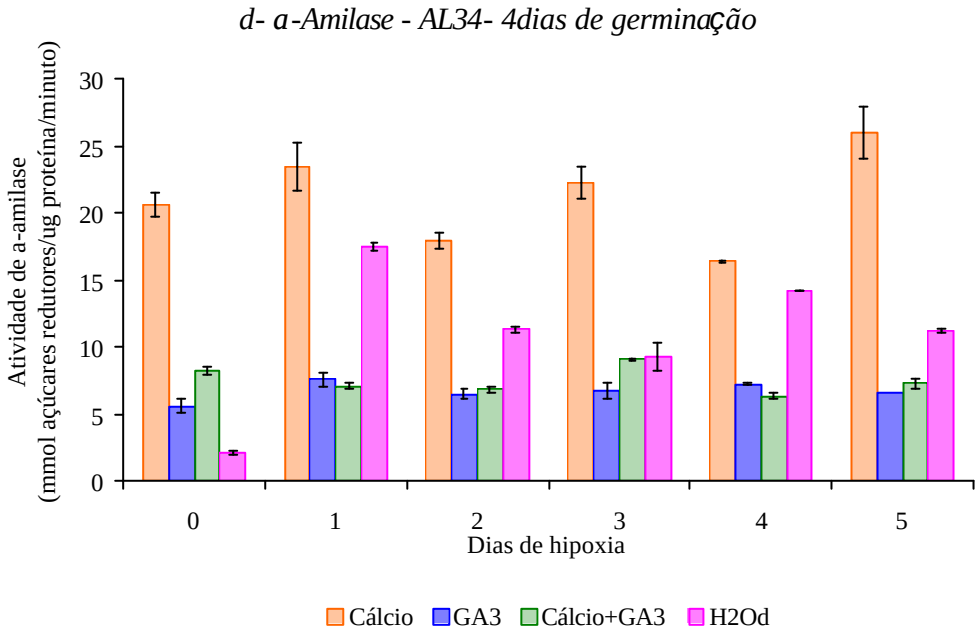
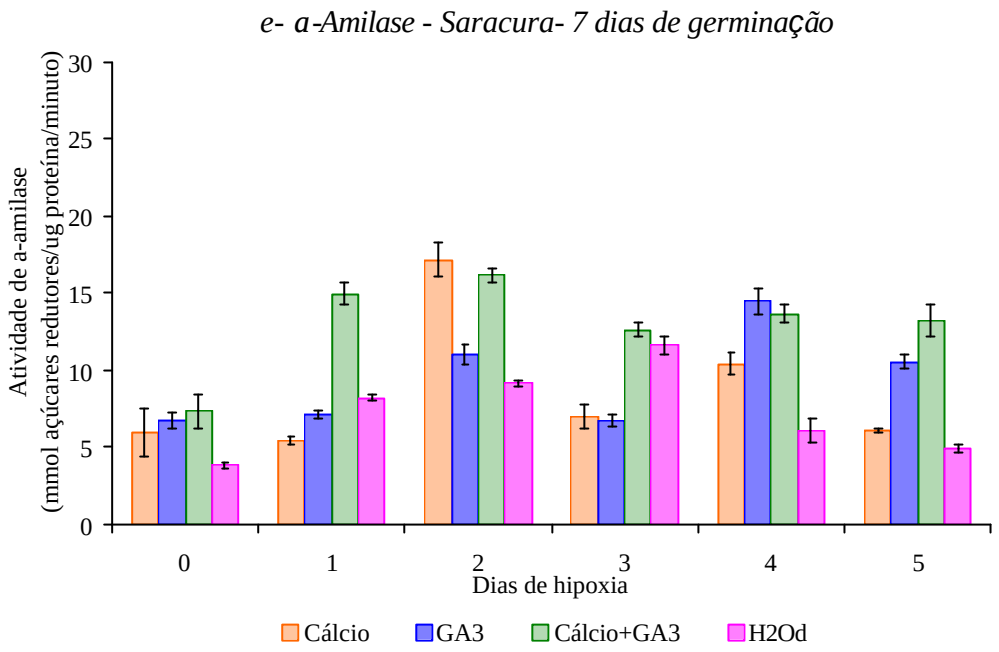




Figura 14. continuação...



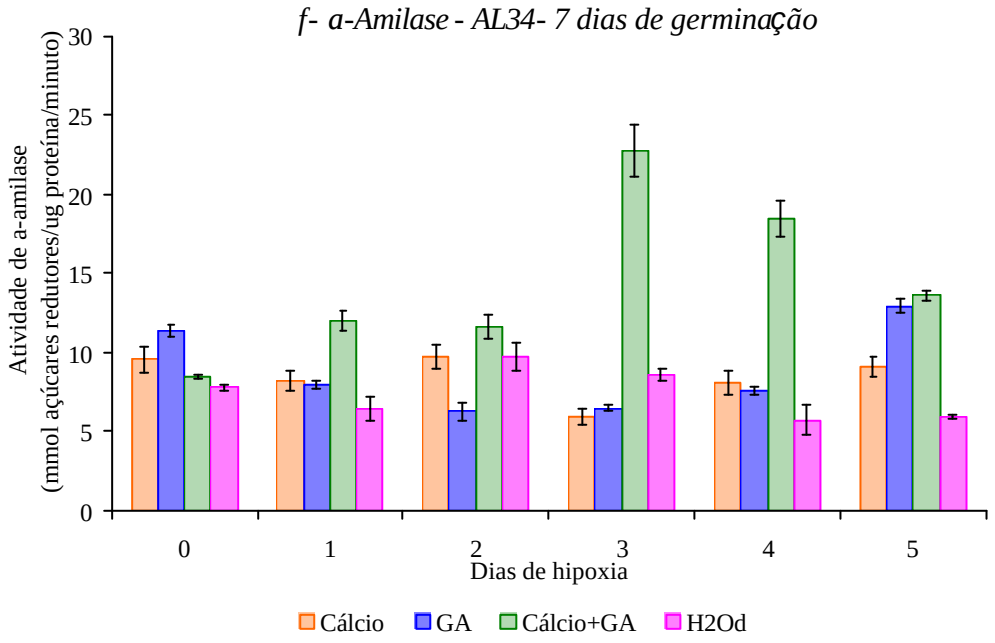




Figura 14. continuação...

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que as sementes a cultivar Saracura são mais tolerantes à hipoxia que as da cultivar AL34, e que em ambas as cultivares a deficiência de oxigênio inibe a degradação e mobilização das reservas, reduzindo, desta forma, a capacidade de expressão da qualidade fisiológica das sementes.

Apesar de os tratamentos químicos com $CaCl_2$ e $GA_3$ individualmente não atuarem de forma satisfatória para reduzir o estresse das sementes, quando aplicados juntos apresentam sinergismo, aumentam atividade amilolítica e melhoram as condições de germinação das sementes em períodos iniciais de alagamento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A SEMENTE E SUA GERMINAÇÃO. Universidade Federal de Santa Maria –UFSM. http://www.ufsm.br/sementes/textos/semeger.shtml, 2002. Acessado em 28/10/2002.

AKAZAWA, T & HARA-NISHIMURA, I. Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intercellular storage of proteins in plan cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 36, p.441-472, 1985.

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.

ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M.M.; GOULART, P.F.P.; DANTAS, B.F.;GOUVÊA, J.A.; PURCINO, R.P.; MAGALHÃES, P.C.;FRIES, D.D.; LIVRAMENTO, D.E.; MEYER, L.E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho "Saracura" (BRS4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p-42-53, 2002.

AOSA-ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigour testing handbook**. East Lansing, 1983. 88p.

ARMSTRONG, W.; BRÄNDEL, R.; JACKSON, M.B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica** v.43, p.307-358. 1994.

ASHFORD, A.E. & GUBLER, F. Mobilization of polysaccharide reserves from endosperm. In: MURRAY, D.R. (ed) **Seed Physiology**. London: Academic Press, v.2. 1984. p. 117-161.

BASAVARAJAPPA, B.S.; SHETTY, H.S.; PRAKASH, H.S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds. **Seed Science & Technology,** v.19, p.279-286, 1991.

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

BERTANI, A., BRAMBILLA, I., MENEGUS, P. Eflect of anaerobiosis on rice seedlings: growth, metabolic rate, and fate of fermentation products. **Journal of Experimental Botany.** v. 31, p. 325-331, 1980.

BEVILAQUA, G.A.P.; PESKE, S.T.; SANTOS-FILHO, B.G. Desempenho de sementes de arroz irrigado tratadas com regulador de crescimento. I. Efeito na emergência a campo. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15,n.1, p.75-80, 1993.

BEVILAQUA, G.A.P.; PESKE, S.T.; SANTOS-FILHO, B.G.; SANTOS, D.S.B. Efeito do tratamento de sementes de cenoura com reguladores de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.8, p.1271-1280, 1998.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relations to germination**. Berlim, Springer-Verlag, 1978. v.1, 306p.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Seeds. Phyisiology of development and germination.** New York: Plenum Press. 1985. 367p.

BRAAM, J.; SISTRUNK, M.L.; POLISENSKY, D.H; XU, W.; PURUGGANAN, M.M.; ANTOSIEWICZ, D.M.; CAMPBEL,P.; JOHNSON,K.A. Plant responses to environmental stress: regulation and function of the Arabidopsis TCH genes. **Planta,** v.203, p. S35-S41, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS,H.P.; LIMA,D.U Polissacarídeos ded reserva de parede cellular em sementes. Estrutura , metabolismo funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12 (edição especial), p.136-162, 2000.

BUSH, D.S. Calcium and signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.95-122, 1995.

BUSH, D.S.; STICHER, L.; JONES, R.L. Gibberellin $A_3$-regulated $\alpha$-amylase synthesis and calcium transport in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells. In:

**Gibberellins.** TAKASHI, N.; PHINNEY, B.O.; MACMILLAN, J. (eds.). Tokyo: Springer-Verlag, 1990. 426p.

BYRUM, J. R. & L. O. COPELAND. Variability in vigour testing of maize (Zea mays L.) seed. **Seed Science & Technology**.v.23, p.543-549, 1995.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. Composição quimica de sementes. In: **Sementes, ciência, tecnologia e produção.** Jaboticabal: FUNEP. 2000. p. 66-97.

CHANDLER, P.M., ZWAR, J.A., JACOBSEN, J.V., HIGGINS, T.J.V. & INGLIS, A.S. The effect of gibberellic acid and abcisic acid on α-amilase mRNA levels in barley aleurone layers. Studies usind na α-amilase cDNA clone. **Plant Molecular Biology**, v.3 p.407-18, 1984.

COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL- CATI, Departamento de sementes e mudas, http://www.cati.sp.gov.br/produtos/index.htm, 2002. Acessado em 03/06/2002.

CRAWFORD, R.M.M. Metabolic adaptations to anoxia. In: **Plant life in anaerobic environments.** HOOK, D.D. & CRAWFORD, R.M.M. (eds.). Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1978. p.119-136.

CRAWFORD, R.M.M. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. **New Phytologist**, London. v.79, p.511-517. 1977.

CUNHA, R. & CASALI, W.D. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia vegetal**, Brasília, v.1, n.2, p.121-132, 1989.

DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Teste de alagamento para avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.22, n.2, p.288-292, 2000.

DAS, G. & SEN-MANDI, S. Scutellar amilase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. **Annals of Botany**, London, v.69, n.6, p.497-501, 1992.

DEBOER, D.W. & RITTER, W.F. Flood damage to crops in depression areas of North Central Iowa. **Transactions of ASAE,** v.13, n.5, p.547-549, 1970.

DELOUCHE, J.C. & BASKIN, C.C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology,** Zürich. v.1, p.427-452, 1973.

DREW, M.C. Oxygen deficieny and root metabolism: injury and acclimatation under hypoxia and anoxia, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** v.48, p.223-250, 1997

DUKE, S.H. & KAKEFUDA, G. Role of testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. **Plant Physiology,** Rockville, v.67, p.449-456, 1981.

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

DURE, L.S. Site of origin and extent of amylases in maize germination. **Plant Physiology**, v.35, p.925-934, 1960.

EDMOND, J.B. & DRAPALA, W.J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra see.Proceedings of the **American Society of Horticultural Science**, v.71, p.428-434, 1958.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- Embrapa Milho e Sorgo, http://www.cnpms.embrapa.br/br154.html, 2002. Acessado em 03/06/2002.

EYSTER, C.H. The cause of decreased germination of bean seeds soaked in water. **American Journal of Botany,** v.27, p.652-659, 1940.

FANNON J.E.; HAUBER, R.J.; BEMILLER, J.N. Surface pores of starch granules. **Cereal Chemistry,** v.69, p.284-288, 19992.

FAUSEY, N.R. & MCDONALD JR, M.B. Emergence of inbred and hybrid corn following flooding. **Agronomy Journal,** v.77, p.51-56, 1985.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 40, p. 305-346, 1989.

GILORY, S. & JONES, R.L. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of plama membrane in barley (*Hordeeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. **Plant Physiology.** v.104, p.1185-1192, 1993.

GILORY, S. Signal tranduction in barley aleurone protoplasts is calcium dependent and independent. **Plant Cell.** v.8, p.2193-2209, 1996.

GOUVÊA, J.A. de. **Crescimento inicial e sobrevivência do milho (*Zea mays* L.), cv. Saracura BR 154, em hipoxia sob diferentes condições de alagamento.** Lavras: UFLA, 2001. 33p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal)

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.

HE, C.J.; FINLAYSON, S.A.; DREW, M.C.; JORDAN, W.R.; MORGAN, P.W. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of *Zea mays* subjected to mechanical impedance and hypoxia. **Plant Physiology**, v.112, p.1679-1685. 1996a.

HE, C.J.; MORGAN, P.W.; DREW, M.C.. Transduction of an ethylene signal required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation during hipoxia. **Plant Physiology**, v.112 p.463-472. 1996b.

HIGGINS, T.J.V., ZWAR, J.A. & JACOBSEN, J.V. Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α-amilase in barley aleurone layers. **Nature**, v.260 p.166-169, 1976.

HOU, F.F. & THSENG, F.S. Studies on the flooding tolerance of soybean seed: varietal diferences. **Euphytica,** v.57, p.169-173, 1991.

ISLEY, D. Vigor tests. **Proceedings of the Association of the Official Seed Analysts**, v.47, n.1, p.176-182, 1957.

ISTA. International Rules for Seed Testing. **Seed Science & Technology**. (Supplement) v.27, p.1-333, 1999.

JUSTIN, S.H.F.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of root and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, v.106 p.465-495. 1987.

KHOSRAVI, G.R. & ANDERSEN, I.C. Pre-emergence flooding and nitrogen atmosfere effects on germinating corn inbreds. **Agronomy Journal,** v.82, p.495-499, 1990.

KOTOWISKI, F. Temperature relations to germination of vegetable seeds. **Proceedings of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.23, n.1, p.176-184, 1926.

KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. Effect of flooding on water, carbohydrate and mineral relation. In: **Floodoing and Plant Growth.** Kozlowiski, T.T. 1984. p.165-188.

KOZLOWSKI, T.T.& PALLARDY S.G. **Growth control in woody plants**. American Press: San Diego, 1997.

KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity. http//www.heronpublishing.com/monograf/koslowiski.pdf, 2002. Acessado em 03/06/2002.

KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington, DC: OEA – Prog. Reg. Desenv. Cient. Tecnol., 1983. 174p. (Biologia, Monografia, 24).

LENTON, J.R.; APPELFORD, N.E.J.; CROKER, S.J. Gibberellins and α-amylase gene expression in germinatin wheat grains. **Plant Growth Regulators,** v.15, p.261-270, 1994.

LEVITT, J. **Introduction to plant physiology**. 2ª. ed., Saint Louis: The C.V. Mosby Company,1974, 447p

LIMA, G.P.P.; RODRIGUES, J.D. & BRASIL, O.G. Efeito de giberelina em variáveis bioquímicas durante o crescimento inicial de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado in vitro. I teores de açúcares redutores e proteínas. **Científica**, São Paulo, v.21, n.2, p.265-274, 1993.

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.

MAGUIRE, J.A. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utlização. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes.** KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. (eds.). Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1998, 270p.

MARTIN, B.A.; SMITH, O.S. & O'NIEL, M. Relationships between laboratory germination tests and field emergence of maize inbreds. **Crop Science,** Madison. v.28, p.801-805, 1988.

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, 1978. 270p.

MCDONALD, M.B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of the Official Seed Analysts**, v.65, n.1, p.109-139, 1975.

MCDONALD, M. B. Assessment of seed quality. **HortScience**. v.15, p.784-788, 1980.

MCDONALD, M.D. & KHAN, A.A. Acid scarification and protein synthesis during seed germination. **Agronomy Journal**, Madison, v.2, n.75, p.111-114, 1983.

MCMANNON, M. & CRAWFORD R.M.M. Metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behaviour. **The New Phytologist**, v.70, p. 299-306, 1971.

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.

NAGAO, M.A. & FURUTANI, S.C. Improving germination of papaya seed by density separation, potassium nitrate, and gibberelic acid. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.6, p.1439-1440. 1986.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes.** KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. (eds.). Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

PALEG, L.G. Physiological effects of gibberellic acid. II. On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm. **Plant Physiology**, v.35, n.2, p.902-6, 1960.

PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES P.E.O.; PACHECO, C.A.; SOUZA, I.R.P.; MEIRELES, W.; CORREA, L.A. Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54- Saracura. Reunião de melhoristas de milho na América Latina. Colômbia. 1997. **In: Anais...** 1997.

PERATA P.; ALPI, A.; LOSCHIAVO, F. Influence of ethanol on plant cells and tissues. **Journal of Plant Physiology**, v.126, p.181-188, 1986.

PERATA, P.;POZUETA-ROMERO, J.; AKAZAWA, T.; YAMAGUCHI, J. Effect of anoxia on starch breakdown in rice and wheat seeds. **Planta,** v.188 p.611-618, 1992.

PERATA P.; GESHI, N.; YAMAGUCHI, J.; AKAZAWA, T. Effect of anoxia in the induction of α-amilase of cereal seeds. **Planta**, v.191, p.402-408, 1993.

PERATA P. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. **Annals of Botany**, v.79 (supplement), p.49-56, 1997.

PESCHKE, V.M.; SACHS, M.M. Characterization and expression of transcripts induced by oxygen deprivation in maize (*Zea mays* L.). **Plant Physiology,** v.104 p.387-394. 1994.

POLLOCK, B.M. & ROOS, E.E. Seed and seedling vigor. In: KOZLOWSKI, T.T. (ed.) **Seed Biology**, v.1, p. 314-318. Academic Press: New York. 1972

PONNAMPERUMA, F.N. Chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy,** San Diego, v.24, p.29-95, 1972.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

PURCINO, R.P. **Efeito fisiológico do cálcio na germinação e no crescimento inicial de plântulas de milho da variedade BRS 4154 "SARACURA" e sua relação com o aumeno da olerância ao alagameno.** Lavras: UFLA, 2001. 40p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal)

RAYMOND, P.; AL-ANI, A.; PRADET, A. ATP production by respiration and fermentation and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy seeds. **Plant Physiology**. v. 79, p.879-884, 1985.

REDGWELL, R.J.; FRY, S.C. Xyloglucan endotransglycosylase activity inCREASESDURING KIWIFRUIT (*Actinia deliciosa*) ripenig: implications for fruit softening. **Plant Physiology,** v.103, p.1399-1406. 1993.

REID, J.S.G. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of trigonella foenumgraceum L. (*Leguminosae*). **Planta**. v. 100, p.131-142, 1971.

RICHARD, B.; RIVOAL, J.; SPITERI, ,A.; PRADET, A. Anaerobic stress induces transcription of sucrose synthase in rice. **Plant Physiology**, v. 95, p.669-674, 1991.

ROOD, S. B. & LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.199, p.223-33, 1988.

SACHS MM, FREELING, M, OKIMOTO R. The anaerobic protein of maize. **Cell**. v.20, p.761-767, 1980.

SACHS, M.M.; SUBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize **Journal of Experimental Botany,** v.47, n.294, p.1-15, 1996.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth, 1991. 682p.

SANWO, M. M. & DEMASON, D. A. Characteristics of α-amylase during germination of two high-sugar sweet corn cultivars of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, v.99, n.7, p.1184-92, 1993.

SANWO, M. M. & DEMASON, D. A. Gibberellic acid ($GA_3$)-induced enhancement of α-amylase activity in the aleurone of *shrunken-2* maize kernels. **American Journal of Botany**, v.81, n.8, p.987-96, 1994.

SCHUURINK, R.C.; SEDEE, N.J.A.; WANG, M. Dormancy of the barley grain is correlated with gibberelic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. **Plant Physiology,** v.100, p.1834-1839, 1992.

SISVAK, M.N. & PREISS, J. Starch synthesis in seeds In: **Seed development and germination**. KEIGEL, J. & GALILI, G. (eds.). New York: Marcel Decker, 1994. p.139-162.

SOMME, R. Glycosidades and monosacharides in germinating leguminous seeds. **Acta Chemica Scandinavica**. v.24, p.72-76, 1970.

STEINER , J.J.; GRABE, D.F. & TULO, M. Single and multiple test for predicting seedling emergence of wheat. **Crop Science**, Madison, v.29, n.1, p.782-786, 1989.

SUBAIAH, C.C.; BUSH, D.S. & SACHS, M.M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cells. **The Plant Cell,** v.6, p.1747-1762, 1994.

SUN, Z. & HENSON, C.A. Degradation of native starch granules by barley α-glucosidases. **Plant Physiology**, v.94, p.320-327, 1990.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, Sinauer Associates, 1998. 792p.

TREWAWAS,A. Le Calcium C`est la vie .Calcim makes waves. **Plant Phisiology**, v.118, p.1-6, 1999.

UENO, K. & TAKAHASHI H. Varietal variation and physiological basis for inhibition of wheat seed germination after excessive water treatment. **Euphytica,** v.94, p.169-173, 1997.

VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; M.B. McDONALD Jr. Anaerobic metabolism enzymes as marker of flooding stress in maize. **Plant and Soil,** v.102, p.33-39. 1987.

VANTOAI, T.T.; FAUSEY, N.R.; M.B. McDONALD Jr. Oxigen requirements for germination and growth of flood-susceptible and flood-tolerant corn lines. **Crop Science,** Madison. v.28, p.79-83. 1988.

VARNER, J.E.; RAM-CHANDRA, G. CHRISPEELS, M.J. **Journal of Cell Composition and Physiology**, v.66 (supplement), p.55-60, 1965.

VIEIRA, R.D. & KRZYZANOWSKI, F.C. Teste de condutividade elétrica. **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Eds. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA NETO, J.B. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

VITORINO, G.P.F.P. **Caracterização da tolerância da variedade de milho saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações de parede celular.** Lavras: UFLA, 1999. 49p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal)

WOODSTOCK, L.W. Seedling growth as a measure of seed vigor. **Proceedings of the International Seed Test Association**, v.34, p.273-280, 1969.

WOODSTOCK, L.W. Physiological and biochemical tests for seed vigor. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.1, n.1, p.127-157, 1973.

YANG, Z. signal transducing proteins in plants: an overview. In: VERMA, D.P.S. (ed) **Signal transduction in plant growth and development**. New York: Springer-Verlag, 1996. p. 1-37.

YOUNG, T.E.; DEMASON, D.A.; CLOSE, T.J. Cloning of an α-amylase cDNA from aleurone tissue of germinating maize seed. **Plant Physiology**, v.105, n.2, p.759-760, 1994.

ZAMSKI, E. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds:the seed as a sink. In: **Seed development and germination**. KEIGEL, J. & GALILI, G. (eds.). New York: Marcel Decker. 1995. p.139-162.

ZEIGLER, P. Carbohydrate degradation during germination. In: **Seed development and germination**. KEIGEL, J. & GALILI, G. (eds.). New York: Marcel Decker. 1995. p.139-162.