



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**CRESCIMENTO INICIAL E
SOBREVIVÊNCIA DO MILHO (*Zea mays* L.),
cv. SARACURA BR 154, EM HIPOXIA SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ALAGAMENTO**

JORGE ALBERTO DE GOUVÊA

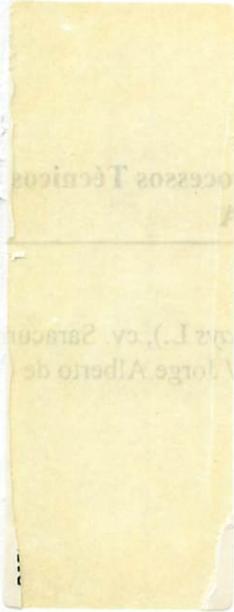
2001

51730

MFU. 36488

JORGE ALBERTO DE GOUVÊA

**CRESCIMENTO INICIAL E SOBREVIVÊNCIA DO MILHO
(*Zea Mays* L.), cv. SARACURA BR 154, EM HIPOXIA SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO**



Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Professor Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Gouvêa, Jorge Alberto de

Crescimento inicial e sobrevivências do milho (*Zea mays* L.), cv. Saracura BR 154, em hipoxia sob diferentes condições de alagamento / Jorge Alberto de Gouvêa. -- Lavras : UFLA, 2001.

33 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Hipoxia. 2. Milho. 3. Crescimento inicial. 4. Sobrevivência ao alagamento. 5. Pressão osmótica. 6. Sais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.334

-633.15

JORGE ALBERTO DE GOUVÊA

**CRESCIMENTO INICIAL E SOBREVIVÊNCIA DE
MILHO (*Zea Mays L.*), cv. SARACURA BR 154, EM HIPOXIA
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALAGAMENTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 06 de março de 2001.

Dr. Amauri Alves de Alvarenga

UFLA

Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima

UFLA


Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,

pela vida;

aos meus pais Jorge Alberto Brandão de Gouvêa (in memorian) e

Maria Teresinha Albuquerque de Gouvêa, pelo amor dedicado.

OFEREÇO

A todos aqueles que contribuíram para esta realização;

às minhas irmãs Lúcia e Celeneh.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Senhor Jesus Cristo, pelo poder infinito de amor e misericórdia, que me trouxe e amparou até a completa realização de mais esta etapa.

A meus pais Jorge Alberto Brandão de Gouvêa (in memorian) e Maria Teresinha Albuquerque de Gouvêa, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

Ao orientador, José Donizeti Alves, pelo suporte, pela amizade e confiança.

Ao co-orientador Marcelo Murad Magalhães, pela presença e auxílio prestados.

Ao amigo e companheiro Luc Felicianus Marie Rows pela parceria nos trabalhos.

Aos amigos e colegas da turma de ingresso no I semestre de 1999, Edna Maria Alves e Breno Régis dos Santos, pela amizade, companheirismo, apoio, ajuda e incentivos.

Aos colegas do grupo da biologia molecular: Laudiene, Marina, Rúbia, Patrícia e Liziane pelo auxílio e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga, quando então coordenador pelo apoio e atenção prestados.

Aos funcionários Lena, Tanhan, Joel, Mauro, Odorêncio.

A todos os professores do Setor de Fisiologia Vegetal e demais departamentos.

Aos demais colegas do curso de Fisiologia Vegetal pela convivência amigável.

Às agências de fomento à pesquisa FAPEMIG e CAPES pela concessão das bolsas de estudo que viabilizaram a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Jorge Alberto de Gouvêa, filho de Jorge Alberto Brandão de Gouvêa e de Maria Teresinha Albuquerque de Gouvêa, nasceu na cidade de Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul em 02 de Novembro de 1964.

Diplomou-se em agronomia pela Universidade de Passo Fundo (UPF), Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Passo Fundo em 21 de Janeiro de 1995.

Em 10 de Maio de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluído em 06 de Março de 2001.

SUMÁRIO

Lista de símbolos.....	i
1 RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
2 INTRODUÇÃO	1
3 REFERENCIAL TEÓRICO	3
4 MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Cultivar utilizada	7
4.2 Indução do estresse hipóxico.....	7
4.3 Hipoxia com diferentes sais no tampão de alagamento	8
4.3.1 Sobrevivência das plântulas e crescimento de raiz seminal	9
4.4 Teor de Cálcio na parede celular de plântulas submetidas à hipoxia	9
4.4.1 Análise da parede celular	10
4.4.1.1 Extração da parede celular	10
4.4.1.2 Determinação do Cálcio na parede celular.....	11
4.5 Germinação de cariópses em tampões de alagamento com diferentes pressões osmóticas	11
4.6 Hipoxia de plântulas em tampões de alagamento com diferentes pressões osmóticas	11
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6 CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE SÍMBOLOS

ψ_w = potencial hídrico

v/v = volume por volume

p/v = peso por volume

M = molar

mM = mili molar

mg = mili grama

L = litro

MPC = Material de Parede Celular

g/L = grama por litro

L/min = litro por minuto

1 RESUMO

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

Este trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento da cultivar de milho (*Zea Mays*), BR-154 (Saracura), à hipoxia com diferentes sais no tampão de alagamento. Para tanto, cariópses da cultivar foram colocados para germinar em rolos de papel de germinação embebido em solução de CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , a 0,0689 M e Manitol 0,1015 M, com todos os tratamentos ajustados na mesma osmoconcentração e água como controle. Após quatro dias em estufa a 28 °C, os rolos foram colocados em tubos plásticos, contendo solução tampão Tris a 5 mM, pH 8, isento de oxigênio e suplementada com as mesmas soluções salinas utilizadas na germinação, onde permaneceram por quatro dias. Em seguida ao período de hipoxia, as plântulas foram transferidas para bandejas com vermiculita, em sala-de-crescimento a 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da sobrevivência das plântulas foi realizada no 3º e 6º dias após o transplante, com base na formação e enverdecimento de folhas. Verificou-se que houve um efeito significativo na diminuição do crescimento das plântulas em função do aumento da pressão osmótica das soluções, o que resultou numa sobrevida igualmente significativa em relação ao controle. A redução no crescimento nas plântulas tratadas com CaCl_2 foi drástica, resultando na maior sobrevivência deste tratamento sobre os demais, evidenciando funções deste cátion no aumento da tolerância à hipoxia. Também foi verificado o efeito do aumento da pressão osmótica no crescimento e nos sintomas das plântulas em hipoxia, através de soluções tampões com diferentes concentrações de Manitol. Para estas avaliações, cariópses da cultivar de milho (*Zea Mays*), BR-154 (Saracura) foram colocados para germinar em papel de germinação, umedecidos com soluções de Manitol, nas seguintes concentrações (MPa): Zero, -0,1257 (9,245 g/L); -0,2514 (18,49 g/L); -0,3771 (27,73 g/L); 0,5028 (36,98 g/L). Os rolos foram então colocados em estufa a 28 °C no escuro por quatro dias. Após este período, quatro rolos de papel de germinação contendo 25 plântulas em cada um foram colocados em recipientes contendo 1,2 L de tampão de alagamento nas mesmas variações de pressão osmótica utilizadas na germinação acrescidos de 5mM Tris, 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH

* Comitê Orientador: José Donizeti Alves - UFLA (Orientador), Luiz Carlos de Oliveira Lima - (UFLA), Amauri Alves de Alvarenga - (UFLA).

8. Os rolos foram totalmente submersos e acondicionados na posição vertical nos tubos de alagamento selados e deixados a 26 ± 2 °C no escuro por 4 dias. Ficou evidenciado, uma relação direta entre a queda no potencial hídrico da solução com a diminuição do crescimento das plântulas, e no número de plântulas com sintomas. Também a partição de esqueletos carbônicos das cariópses para as plântulas durante a germinação foi afetada em função do ajuste osmótico necessário ao longo do aumento da pressão osmótica das soluções. Na medida em que houve uma queda no potencial hídrico da solução tampão, menos reservas foram alocadas das cariópses para as plântulas. Conclui-se desta forma que a variação nas osmoconcentrações implicam em reduções na alocação de reservas das cariópses e no crescimento das plântulas, contribuindo até certo limite para o aumento da tolerância das plântulas ao alagamento. Já o efeito do aumento na tolerância de plântulas à hipoxia, devido à presença de Cálcio na solução tampão, fica caracterizado em parte pela queda do potencial hídrico da solução, mas também como uma função fisiológica deste cátion, uma vez que soluções contendo magnésio, outro íon bi-valente, as plântulas não obtiveram a mesma sobrevida.

ABSTRACT

GOUVÊA, Jorge Alberto. **Initial growth and maize (*Zea mays* L.) cv. Saracura BR 154 survival, submitted to hypoxia under different flooding conditions.** Lavras: UFLA, 2001. 33p. (Dissertation - Master in Agronomy - Plant Physiology)*

This work aimed to evaluate the survival and growth of maize cultivar *Zea mays* BR 154 Saracura to hypoxia with different salts in flooding buffer. For this purpose, cultivar caryopses were put to germinate in paper rolls embedded in CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , 0,068 M; Manitol 0,01015 M, and all treatments were adjusted for the same osmotic concentration and water as control. After four days at 28 °C, the rolls were put in plastic tubes containing Tris 5 mM, pH8 buffer solution, without oxygen and supplemented with the same solutions used in the germination, were stayed for four days. After the hypoxia period, the plants were transferred to pots with vermiculite, and kept at 26 °C with 12 h light. The survival evaluation was realized between the 3rd and 6th day after the transference, based in leaf greening plantlet growth associated with increase in osmotic pressure solution, that also increased the survival in relation to control. Thus reduction in plantlet growth treated with CaCl_2 was drastic, resulting in higher survival rate from this treatment in relation to the others, showing the role of this cation in increasing flooding tolerance. It was also verified the osmotic pressure effect on growth and plantlet symptoms under hypoxia, using various buffer Manitol solutions. For these evaluations Saracura BR-154 maize caryopses were put to germinate in rolls paper net with manitol solutions with the following concentrations (MPa); zero; -0,1257 (9,245 g/L); -0,2514 (18,47 g/L); -0,3771 (27,73 g/L); -0,5028 (36,98 g/L). The paper rolls were left at 28 °C during four days in dark. After this time, four rolls containing 25 plantlets each one were put in recipients containing 1.2 L of flooding buffer with the same concentration variations in osmotic pressure than that ones used in germination in addition to 5mM Tris, 100 mg L⁻¹ ampicillin, pH 8. The rolls were fully submerged and set in vertical position in closed flooding tubes and at 26 ± 2 °C in dark for four days. It was observed a direct relationship between water potential solution drop and a decrease in plantlets growth and the number of plantlets with symptoms. The carbonic backbone partitioning from caryopses to plantlets during the increase in osmotic pressure solutions. When it was observed a correlation between a decrease in water potential with lower content

* Guidance Committee: José Donizeti Alves - UFLA (Major Professor), Luiz Carlos de Oliveira Lima - (UFLA), Amauri Alves de Alvarenga - (UFLA).

of reserve translocated from cariópses to plantlets. So the variation in osmoconcentration imply in reductions in cariópses reserve translocation and plantlet growth, contributing until a determined level for the plantlet tolerance increase to flooding. The calcium effect added in floding buffer in order to increase flooding tolerance was characterized by a decrease in water potential solution as well a physiological function of this cations, because solutions containing magnesium, other divalent ion, did not cause the same plantlet survival level.

2 INTRODUÇÃO

As inundações causadas por chuvas pesadas e/ou má drenagem do terreno em áreas agrícolas constituem-se no maior problema em algumas regiões de Minas Gerais e do Brasil. Muitas culturas como milho são intolerantes a inundações por causarem uma falta (hipoxia) ou ausência (anoxia) de oxigênio no solo. Preocupado com o problema, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) desenvolveu e lançou no mercado uma cultivar de milho tolerante ao alagamento temporário, a cultivar Saracura BR 154

As consequências fisiológicas de um processo anóxico caracterizam-se para a maioria das plantas em uma redução do acúmulo de matéria seca e produtividade e, em períodos mais extensos, à morte. Foi observado que algumas cultivares de milho como a B73Ht, cultivada no estado de Illinois/USA, normalmente conseguem sobreviver sob estresse anaeróbico por um período de três dias (Lemke-Keys e Sachs, 1989). No Brasil, a cultivar Saracura BR-154, revelou-se como uma das mais adequadas para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento. Nessas condições o peso de espigas aumentou em 25 % enquanto que sob condições normais de água no solo, o aumento verificado foi de apenas 14 % (Parentonni et al., 1997).

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) iniciou em 1998 um projeto, em conjunto com a Universidade do Estado de Ohio, Universidade de Illinois e com o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA-CNPMS), para caracterizar os fatores específicos de tolerância à inundação da cultivar Saracura BR 154, objetivando a identificação e caracterização destes genes de tolerância ao alagamento. Estes genes poderiam vir a ser transferidos para outras cultivares de milho com características agronômicas de interesse, tornando-as

também mais tolerantes ao alagamento, viabilizando assim o uso de áreas sujeitas à inundações intermitentes.

Este trabalho objetivou testar o efeito no crescimento inicial e na sobrevivência de plântulas de milho, cultivar Saracura BR 154, quando submetidas a processos anóxicos com diferentes soluções de alagamento; observar as implicações que o aumento da pressão osmótica, decorrentes da adição de diferentes sais nas soluções de alagamento, provoca no crescimento inicial e na sobrevivência destas plântulas submetidas à hipoxia. Verificar através da determinação das concentrações de Cálcio na parede celular, se o suplemento exógeno de íons de cloreto de Cálcio na tampão de alagamento resulta num teor maior deste cátion na parede celular das plântulas submetidas ao processo de hipoxia.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

No Brasil existem extensas áreas de várzeas com aptidão para uso agrícola, entretanto, em condições de solos inundados, a difusão de O_2 se torna muito baixa gerando uma diminuição da concentração deste gás (Kozlowski e Pallardy, 1984) e, como consequência, manifestam-se, nas plantas, vários distúrbios em seu metabolismo, reduzindo tanto o crescimento vegetativo como o reprodutivo (Kozlowski, 1984; Drew 1997). A deficiência de oxigênio no solo causada pelo excesso de água altera a expressão de genes, levando, em alguns casos, a um ajustamento metabólico, anatômico ou morfológico, que permite às plantas sobreviverem por períodos de tempo mais prolongados nessa condição desfavorável (Drew, 1997).

Nos primeiros momentos de estresse hipóxico, ocorre uma repressão na biosíntese de proteínas aeróbicas, acompanhada de progressiva indução da síntese de 20 polipetptídeos, conhecidos como anaeróbicos (ANPs), em raízes primárias de plântulas de milho (Sachs, Freeling e Okimoto, 1980), tais como álcool desidrogenase (Sachs e Freeling, 1978), aldolase (Kelley e Tolan, 1986), sacarose sintase (Springer et al., 1986), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Russel e Sachs, 1991), enolase, glucose-6fosfato isomerase (Kelley e Freeling, 1984) e piruvato descarboxilase (Lazlo e Lawrence, 1983). Dentre os ANPs, destaca-se a importância da enzima álcool desidrogenase (ADH) no aumento da tolerância de plantas de milho à hipoxia (Hole et al, 1992). A tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio pode também estar relacionada com a utilização de vias alternativas, com produtos finais menos prejudiciais à sobrevivência das células do que o etanol, tais como malato, aspartato, piruvato, succinato, alanina, serina e outros (Vartapetian e Jackson, 1997).

Considerando a severidade do estresse hipóxico, existem várias espécies de plantas, especialmente aquelas mais adaptadas a ambientes alagados, que respondem favoravelmente a uma baixa oxigenação do solo, com a formação de aerênquima (Kawase, 1981; Justin e Armstrong, 1987; Drew, 1997). A presença dos polipeptídeos anaeróbicos (ANPs) pode induzir mudanças metabólicas que, por consequência, causam diferentes tipos de adaptações anatômicas e morfológicas como formação de aerênquimas (He, Drew e Morgan, 1994). Drew, Jackson e Giffard (1979) e He, Morgan e Drew (1996) observaram que a condição de hipoxia induziu a produção de etileno endógeno e este, atuando como um mensageiro secundário, provocaria a formação de aerênquimas. Este processo de formação de estruturas morfológicas em processos anóxicos poderia ocorrer bioquimicamente através da ativação da biosíntese de enzimas de hidólise de parede celular como a celulase, a poligalacturonase (PG), xiloglucano endo-transglicolase (XET), pectina esterase (PE), que provocam um afrouxamento de parede celular, resultando no início do processo lisígeno das células.

Dantas (1999) verificou a indução da formação de grandes espaços intercelulares, formando aerênquima lisígenos tanto em raízes como em coleótilos de plântulas de milho (*Zea mays* L.) cultivar Saracura BR-154, devido ao aumento na atividade das enzimas de degradação e afrouxamento de parede celular, celulase, poligalacturonase (PG) e xiloglucano endo-transglicolase (XET). Observou também que o fornecimento de Cálcio exógeno a essas plântulas inibiu o desenvolvimento deste aerênquima. Segundo Vitorino, (1999), esta inibição parece estar relacionada com um possível efeito de proteção da parede celular contra as enzimas de hidrólise de parede celular, causada pela presença de cátions de Cálcio junto à parede celular devido ao fornecimento de Cálcio exógeno.

Ao estudar a influência do Cálcio na estabilidade da parede celular, Subbaiah, Zhang e Sachs (1994) pesquisaram o envolvimento do Cálcio intracelular mediante o uso de antagonistas do Cálcio ou de bloqueadores de canais de Cálcio. A conclusão foi que esse elemento exerce importante papel na sobrevivência de plântulas de milho em ambiente anaeróbico. Segundo diversos autores, o Cálcio estaria atuando como um elemento importante na transdução de estímulos externos em respostas metabólicas (Aurisiano, Bertani e Reggiani, 1995; Felle e Hepler, 1997). Sob hipoxia, a mobilização do Cálcio de reservatórios intracelulares até o citoplasma induz a transcrição dos mRNAs *adh1* e *sh1* que, uma vez traduzidos, levam à síntese das enzimas anaeróbicas como a álcool desidrogenase e sacarose sintase, respectivamente (Sheen, 1996; Subbaiah, Zhang e Sachs, 1994).

Apesar destas pesquisas indicarem que o Cálcio atua como um mensageiro secundário na percepção de sinais externos ambientais (Subbaiah, 1996), vários trabalhos de pós colheita demonstram que a aplicação de Cálcio exógeno tem estendido a vida de prateleira de frutos de manga e pêsego como resultado de uma maior estabilidade da parede celular (Lima, 1997; Souza, 1998). A relação entre o Cálcio e a parede celular pode, em parte, explicar a manutenção da firmeza e o aumento da resistência dos frutos à invasão por alguns micro organismos (Conway, Sams e Watada, 1995). O modelo mais aceito de ligação do Cálcio aos poligalacturonatos é do tipo "egg box" (Burns e Pressey, 1987). O processo de ligação do Cálcio com a parede celular de tecidos de plantas ocorre por meio de ligações iônicas dos grupos carboxílicos livres dos polímeros de ácidos urônicos na parede celular (Siddiqui e Bangerth, 1996; Saftner e Conway, 1998). Estudos realizados por Kobayashi et al. (1999) demonstraram que além do borato, o Cálcio ligado às ramnagalacturonanas são responsáveis pela estabilização dos polissacarídeos pécticos e, conseqüentemente, da parede celular.

Considerando que sob condições de hipoxia, se observa-se um amolecimento da região do mesocótilo de plântulas de milho, como consequência de lises de células causadas, possivelmente por ação de enzimas hidrolíticas (Saab e Sachs, 1996), é possível que o Cálcio atue além de mensageiro secundário como um elemento estrutural, durante o período de déficit de oxigênio. Segundo Salunke, Bolin e Reddy (1991), o Cálcio, ao se associar com substâncias pécticas, provoca restrições espaciais à ação de enzimas hidrolíticas. O fornecimento de Cálcio exógeno prolongou a sobrevivência das cultivares de milho (*Zea mays* L) BR 154 (Saracura) e BR 107, durante o período de alagamento, retardando modificações na parede celular (Vitorino, 1999). Este trabalho caracterizou a evolução dos sintomas de degradação do mesocótilo de plântulas de milho (*Zea mays* L.) em hipoxia e a significativa diferença na sua longevidade sob este tipo de estresse sobre as plântulas na presença ou na ausência de Cálcio exógeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivar utilizada

Foi utilizada para os experimentos a cultivar de milho (*Zea Mays* L.) desenvolvida no CNPMS-EMBRAPA, Saracura BR-154. Esta cultivar foi desenvolvida, a partir de uma ampla base genética, após nove ciclos de seleção massal sob condições de excesso de umidade no solo, onde se obteve como característica principal a capacidade de suportar encharcamentos temporários do solo e o conseqüente potencial de viabilizar o uso em áreas sujeitas ao alagamento intermitente. Apresenta ciclo precoce, altura de planta em torno de 235 cm, altura de espiga 132 cm, produtividade média de 5 a 6,5 t/há, ótima resistência ao acamamento e ao quebramento, grão do tipo semi-duro, cor laranja (Parentoni et al., 1997).

4.2 Indução do estresse anóxico

O procedimento utilizado para indução do estresse anóxico foi o mesmo para os diferentes ensaios. Cariópses da cultivar de milho BR 154 (Saracura), tratadas com 1 g/L do produto comercial CAPTAN 50% são colocadas para germinar em rolos de papel tipo germitest, umedecidos com soluções contendo diferentes químicos e, como controle, água destilada. Após a montagem dos rolos com 25 cariópses cada, estes permanecem em germinador úmido a 28 °C no escuro por quatro dias. As cariópses que não germinam são substituídas por plântulas de rolos extras para que 25 plântulas por rolo sofram o processo de hipoxia.

Após a germinação, quatro rolos de papel germitest são colocados nos tubos de alagamento (100 plântulas por recipiente), constituídos por tubos de PVC de 75 mm de diâmetro, contendo 1,2 L das mesmas soluções utilizadas na germinação, acrescidos de 5mM Tris (Trishydroximethylaminometane), 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH 8 ajustado com HCl, sugerido por Saab e Sachs (1996), que se constituem desta forma nos respectivos tampões de alagamento. Os rolos permanecem totalmente submersos e colocados na posição vertical, seguidos por borbulhamento da tampão de alagamento dentro dos tubos com N₂ (1L min⁻¹) por 3 minutos sendo então imediatamente selados e deixados a 26 ± 2 °C no escuro por 4 dias. Esta operação de borbulhamento é realizada para se obter uma condição de baixa disponibilidade de oxigênio no meio (hipoxia).

4.3. Hipoxia com diferentes sais no tampão de alagamento

Cariópses da variedade de milho Saracura foram colocadas para germinar com soluções contendo diferentes químicos na mesma osmo-concentração: Cloreto de Cálcio (CaCl₂), Cloreto de Magnésio (MgCl₂.6H₂O) e Cloreto de Potássio (KCl), concentração de 0,0689 M, sugerido por Vitorino (1999), para o cloreto de Cálcio; Manitol a 0,1015 M (como um controle para avaliar o efeito da concentração osmótica) e água como testemunha.

Para o processo de hipoxia, foi utilizado como soluções de alagamento as mesmas utilizadas na germinação, acrescidos de 5mM Tris (Trishydroximethylaminometane), 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH 8 ajustado com HCl, sugerido por Saab e Sachs (1996), constituindo-se assim nos respectivos tampões de alagamento.

Após o período de hipoxia, as plântulas foram transferidas para bandejas com vermiculita, em sala-de-crescimento a 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, com a umidade do ambiente preservada por cortina úmida defronte ao

condicionador de ar. As plântulas foram pulverizadas com fungicida Benomil - Belate (4 g.L^{-1}) no primeiro e quarto dias após o transplante. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos (soluções) e 3 repetições.

4.3.1 Sobrevivência das plântulas e crescimento de raiz seminal

Após 4 dias de permanência sob condições de hipoxia, mediu-se o pH dos tampões de alagamento, sendo as plântulas transferidas para bandejas de isopor com vermiculita e colocadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A sobrevivência das plântulas foi avaliada após três dias, observando-se o lançamento e enverdecimento de folhas.

Para verificar o crescimento de raiz seminal durante os 4 dias de germinação, separaram três rolos de cada tratamento, onde foi medido o comprimento de raiz seminal das 25 plântulas. Os mesmos rolos foram abertos e as raízes medidas novamente, após os 4 dias de alagamento, obtendo-se assim a média do comprimento de raízes seminais de 25 plântulas, em três repetições antes e após o alagamento.

4.4 Teor de Cálcio na parede celular de plântulas submetidas à hipoxia

As soluções de germinação constituíram-se de Cloreto de Cálcio (CaCl_2) a $0,0689 \text{ M}$ e água destilada. Nos tratamentos germinados na presença de Cálcio, colocaram quatro rolos por tubo, em três tubos, que não foram alagados. Adicionaram somente 80 mL de tampão de alagamento para preservar a umidade dos rolos que foram imediatamente selados, constituindo-se assim nos tratamentos com Cálcio e presença de oxigênio.

Para os tratamentos submetidos à hipoxia, os tampões de alagamento constituíram-se nas respectivas soluções de germinação acrescidas de 5mM Tris, 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH 8 ajustado com HCl. Desta forma, o delineamento experimental foi de três tratamentos: alagamento com tampão, alagamento com suplemento de Cálcio e não alagado (com O₂), com três repetições, sendo um tubo com quatro rolos por repetição.

4.4.1 Análise da Parede Celular

4.4.1.1 Extração da parede celular

Segmentos do mesocótilo com aparências distintas (normal, translúcido e constrição), obtidos da região distal e proximal, foram seccionados de cada plântula, agrupados juntos e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise.

A parede celular foi extraída, segundo a metodologia proposta por Mitcham e MacDonald (1992), citados por Lima (1997), com algumas modificações. Aproximadamente 20 g de segmentos dos mesocótilos foram triturados em homogeneizador com tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 (15 mL) com adição de azida sódica 0,02%, dodecil sulfato de sódio 1% e de 2-mercaptoetanol 1% (p/v) e mantidos em repouso por 2 horas a 40 °C. Em seguida, o homogenato foi filtrado e o resíduo lavado com 100 mL do mesmo tampão sob filtração a vácuo. Ao resíduo, foram adicionados 30 mL de fenol: ácido acético e água (2:1:1: v/v) mantendo-o em repouso por 20 minutos. Após, lavou-se novamente o resíduo com 100 mL de dimetil sulfóxido 9:1 (v/v), aquecido a 100 °C por 30 minutos e mantido durante a noite, à temperatura ambiente.

Após homogeneização, filtragem e lavagem com cerca de 30 mL de tampão acetato a 0,1 M pH 5, seguidas de sucessivas lavagens com água destilada. O resíduo foi dialisado em membrana de diálise (cut-off 6000-8000) por 24 horas contra água destilada, seguido de filtragem a vácuo. O resíduo contendo material de parede celular (MPC) foi ressuspensão em uma nova solução de amiloglucosidase 220 mg.100mL⁻¹ (6300 unidades/g) em tampão acetato de sódio pH 4,8 e incubado a 40 °C por 2 horas. Em seguida, a mistura foi lavada com água destilada e filtrada. Este resíduo contendo MPC foi submetido ao teste do iodo com KI/I₂ para se verificar a ausência de amido. O MPC foi então ressuspensão em 50 mL de uma mistura de clorofórmio metanol (1:1 v/v), filtrado a vácuo e lavado com acetona, deixando-o secar ao ambiente, obtendo-se então o MPC isolado.

4.4.1.2 Determinação do Cálcio na Parede Celular

A determinação de Cálcio foi realizada através da espectrofotometria de absorção atômica, onde o MPC foi digerido com ácido nítrico/perclórico. Foi adicionado ao MPC, 10 mL de ácido nítrico concentrado e deixado em repouso à temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida procedeu-se à digestão a 150 °C. Quando a maior parte do ácido nítrico foi evaporado e a solução tornou-se, foi adicionado 1 mL de ácido perclórico e a temperatura do digestor foi aumentada para 200 °C. Após o resfriamento os extratos foram diluídos em água.

4.5 Germinação de cariópses em tampões de alagamento com diferentes pressões osmóticas

Cariópses da cultivar de milho Saracura foram colocadas para germinar em rolos de papel germitest, com 25 cariópses cada e umedecidos com soluções

de Manitol, nas seguintes concentrações molares (MPa): Zero; -0,1257 (9,245 g.L⁻¹); -0,2514 (18,49 g.L⁻¹); 0,3771 (27,73 g.L⁻¹) e 0,5028 (36,98 g.L⁻¹). Após quatro dias de germinação no escuro em germinador úmido a 28 °C, as plântulas foram seccionadas em raízes, coleótilo + embrião e cariópses, levados à estufa ventilada para secagem a 76 °C por 72 horas e, posteriormente determinado o peso da matéria seca em balança.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco níveis de pressão osmótica na solução de germinação e três repetições. Cada repetição constituiu-se de um rolo com 25 cariópses.

4.6 Hipoxia de plântulas em tampões de alagamento com diferentes pressões osmóticas

Montou-se um experimento utilizando-se tampões de alagamento, com cinco diferentes níveis de pressão osmótica, obtidos por diferentes concentrações de Manitol. Cariópses da cultivar de milho Saracura foram colocados para germinar em rolos de papel de germinação umedecidos com soluções de Manitol, nas seguintes concentrações molares (Mpa): Zero, -0,1257 (9,245 g/L); -0,2514 (18,49 g/L); 0,3771 (27,73 g/L) e 0,5028 (36,98 g/L). Os tampões de alagamento constituíram-se nas mesmas soluções utilizadas na germinação, acrescidos de 5mM Tris (Trishydroxymethylaminometane), 100 mg.L⁻¹ de ampicilina, pH 8 ajustado com HCl.

Foi medido o comprimento de raízes seminais logo após a germinação e, o comprimento das plântulas, logo após o alagamento. As plântulas foram separadas das cariópses e obtidas os respectivos pesos da matéria fresca e seca (estufa ventilada 76 °C por 72 horas).

Os danos causados nas plântulas pelo processo de hipoxia foram avaliados pelos critérios de presença ou ausência de sintomas nos mesocótilos, conforme caracterização realizada por Vitorino (1999). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos que se constituíram em cinco níveis de pressão osmótica dos respectivos tampões de alagamento, onde cada tratamento foi considerado um tubo com quatro rolos de 25 cariópses cada, em três repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se que, quatro dias após o início da germinação, as soluções de cloreto de Cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio ou manitol, embebidas no papel de germinação, causaram inibição no comprimento de raízes na ordem de 55 % e 18%, respectivamente, quando comparada com a testemunha (Figura 1). Verificou-se, também, que os íons bivalentes Cálcio e magnésio contribuíram com mais 37% do efeito inibitório do crescimento radicular. Por outro lado, a capacidade germinativa das sementes não foi afetada.

Vitorino (1999) e Dantas (1999) verificaram que a germinação de sementes de milho, envoltas em papel de germinação embebido com solução de cloreto de Cálcio a 0,76%, proporcionava às plântulas uma maior tolerância à deficiência de oxigênio, comparativamente àquelas que haviam sido germinadas em papel de germinação embebido em água. Essas plântulas, oriundas de germinação em presença do Cálcio, apresentavam-se, ao final do período de germinação, um menor tamanho tanto da parte aérea quanto do sistema radicular (comunicação pessoal). Nessas pesquisas não foi verificada, entretanto, se a diminuição do crescimento das plântulas foi provocada pela presença do cloreto de Cálcio “per si” ou pela diminuição do potencial osmótico da solução para - 0,25 MPa.

Desta forma os resultados obtidos (Figura 1) com manitol comprovam que o abaixamento da concentração osmótica do meio de germinação das sementes contribuiu com 18% da inibição do crescimento das raízes e que o íon potássio não influenciou neste comportamento.

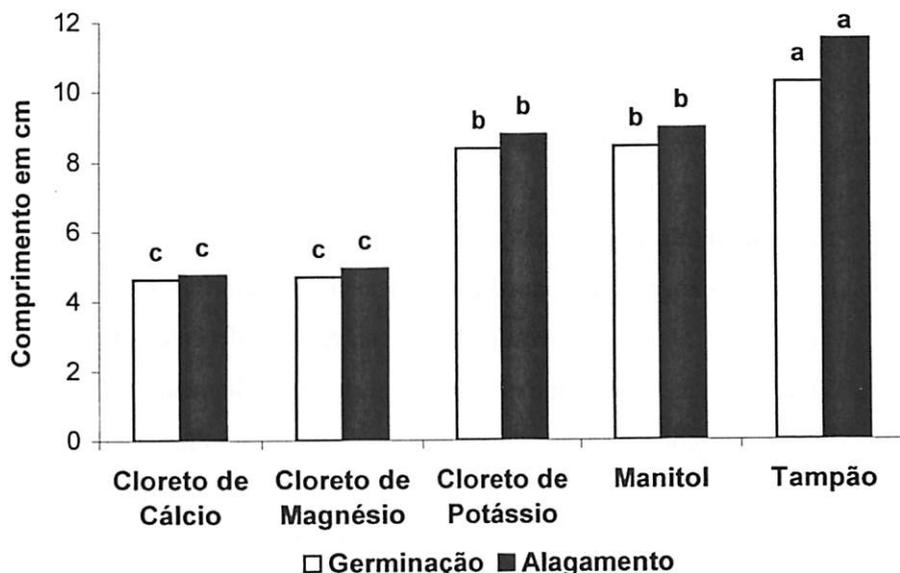


Figura 1 – Comprimento de raiz seminal da variedade Saracura, depois da germinação e, imediatamente após o alagamento. Colunas seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si (Scott-Knott 5%).

Pelas concentrações salinas utilizadas neste experimento é possível que tenha havido decréscimos no potencial osmótico do tecido das sementes, caracterizados, pelo efeito da osmoregulação, os quais incluem um aumento líquido na concentração de soluto mineral nas células. Desse modo supõe-se que o decréscimo no crescimento das plântulas, em meio com menor potencial osmótico, ocorreu devido à redução na disponibilidade de água, o que certamente deve ter ocasionado uma menor taxa de utilização das reservas das sementes.

A grande redução observada no crescimento das raízes de plântulas que germinaram na presença de cloreto de Cálcio se deve tanto ao componente osmótico da própria solução ao papel do Cálcio quanto ao elemento estrutural de

parede celular. Neste caso, existem registros na literatura que relatam a importância da bivalência desse nutriente em formar ligações covalentes com cargas negativas de ácidos poligalacturônicos da pectina e fibras de celulose, impedindo a expansão celular, sugerindo com isso, que as raízes sob tais condições, não podem expandir.

Os resultados do experimento de hipoxia de plântulas, em presença ou ausência de Cálcio exógeno, não apresentaram nenhuma diferença significativa quanto ao teor de Cálcio na parede celular entre os diferentes tratamentos (Figura 2). Isto poderia indicar que não houve nenhuma influência das fontes de Cálcio externas na concentração do cátion na parede celular. Entretanto é possível que o método de extração de parede celular utilizado, com sucessivas lavagens para purificação da parede celular, pode ter lixiviado parte do Cálcio. Também o sistema de coleta de material adotado, em que segmentos de coleótilo da parte distal (apical), onde ocorrem com maior evidência os danos de degeneração de parede celular, e segmentos da parte basal do coleótilo, onde menos se verificam estes danos, tenha contribuído para diminuir as diferenças médias entre os tratamentos. Esta metodologia foi adotada em função da dificuldade de se obter material suficiente de parede celular para as amostras. Então a possibilidade de que o Ca^{2+} possua uma função de fortificar a parede celular, aumentando assim a sobrevivência das plântulas após o estresse hipóxico, permanece.

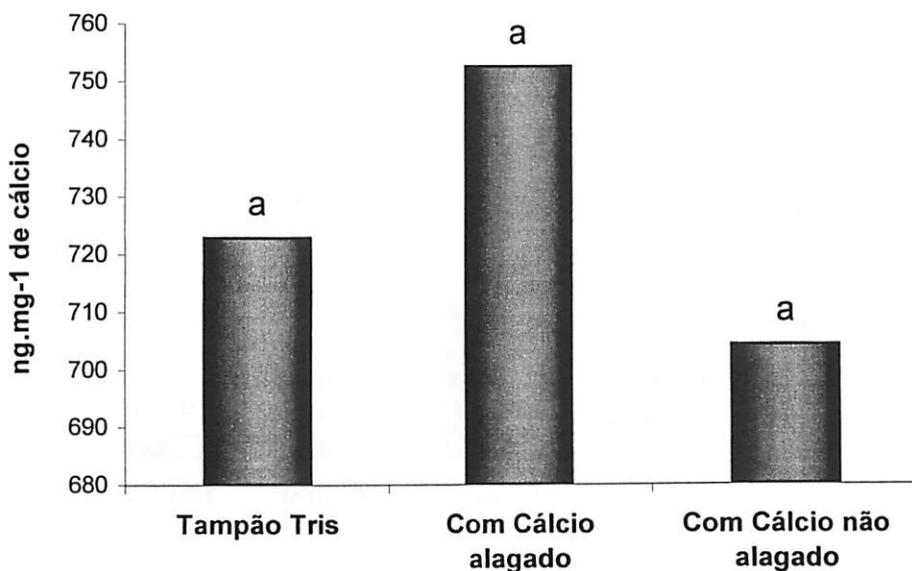


Figura 2 - Teor de Cálcio na parede celular nos diferentes tratamentos após quatro dias de alagamento. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Scott-Knott 5%).

A fim de testar a influência da germinação de cariópses de milho em diferentes meios (soluções de embebição do papel de germinação) na sobrevivência das plântulas ao déficit de oxigênio, foram transferidas plântulas provenientes de cada tratamento para soluções de alagamento acrescidas de suas respectivas soluções. A maior sobrevivência ao alagamento foi observada na presença de cloreto de Cálcio (80%), seguida pelo cloreto de magnésio e/ou cloreto de potássio (45%), manitol (20%) e tampão (5%) aos três e aos seis dias de sobrevivência em vermiculita (Figura 3).

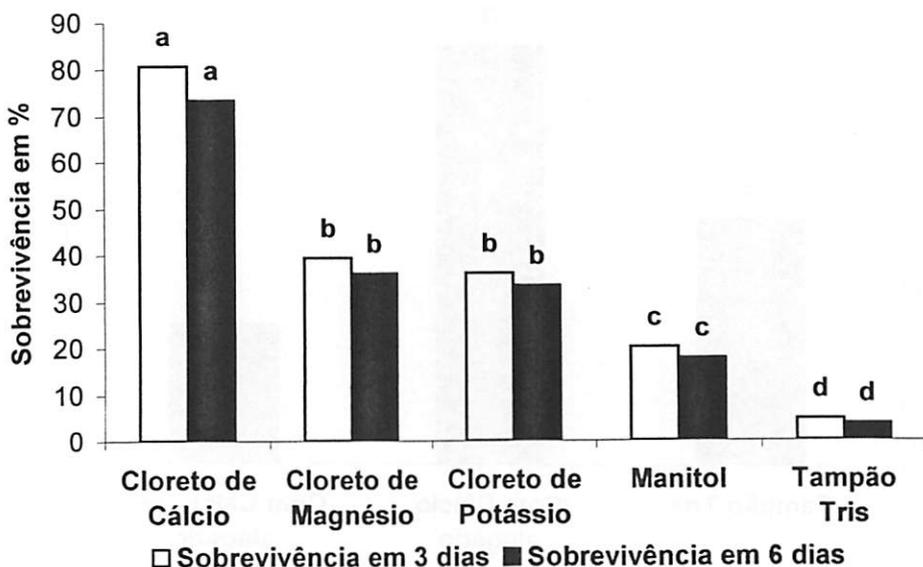


Figura 3 - Sobrevivência da cultivar Saracura ao alagamento por 4 dias, avaliada após o 3º e 6º dias após o plantio em vermiculita. Colunas seguidas de mesmas letras não diferem significativamente entre si (Scott-Knott 5%).

Estes resultados mostram que somente o abaixamento na osmoconcentração da solução para $-0,25$ MPa aumenta a tolerância de plântulas de milho ao alagamento em torno de 20 % e confirmam as observações de Vitorino (1999) que aponta o Cálcio como um importante fator na garantia da sobrevivência das plântulas sob deficiência de oxigênio. Para aquela autora, o Cálcio retarda a lise celular em coleóptiles sob hipoxia, possivelmente pelo seu efeito na manutenção da integridade da parede celular. Experimentos na área de pós-colheita há muito comprovam os efeitos positivos desse cátion na preservação da integridade da parede celular. Nesses casos, o Cálcio promove ligações covalentes entre grupos carboxílicos de ácidos poligalacturônicos de pectinas (Jarvis, 1984), tornando a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis por sua degradação, Conway, Sams e Watada (1995). Dantas (1999) ao avaliar as atividades de enzimas associadas ao metabolismo de parede

como poligalacturonase, xiloglucano endo-transglicosilase e celulase, verificou um aumento na atividade “in vitro” dessas enzimas sem, no entanto, promover a lise de células “in vivo” de plântulas de milho submetidas à hipoxia. Este fato foi atribuído à elevada concentração do Cálcio no apoplasto conferindo uma atividade estrutural do elemento, pelo aumento na formação de pectatos de Cálcio, promovendo uma maior estabilidade da matriz péctica e, por conseguinte, uma diminuição da atividade das enzimas envolvidas no processo de degradação da parede celular pelo menor acesso destas aos seus substratos.

Plântulas de milho submersas em tampão de alagamento, acrescido de diferentes soluções com concentração osmótica de $-0,25$ MPa, apresentaram distintas taxas de crescimento de raiz (Figura 4).

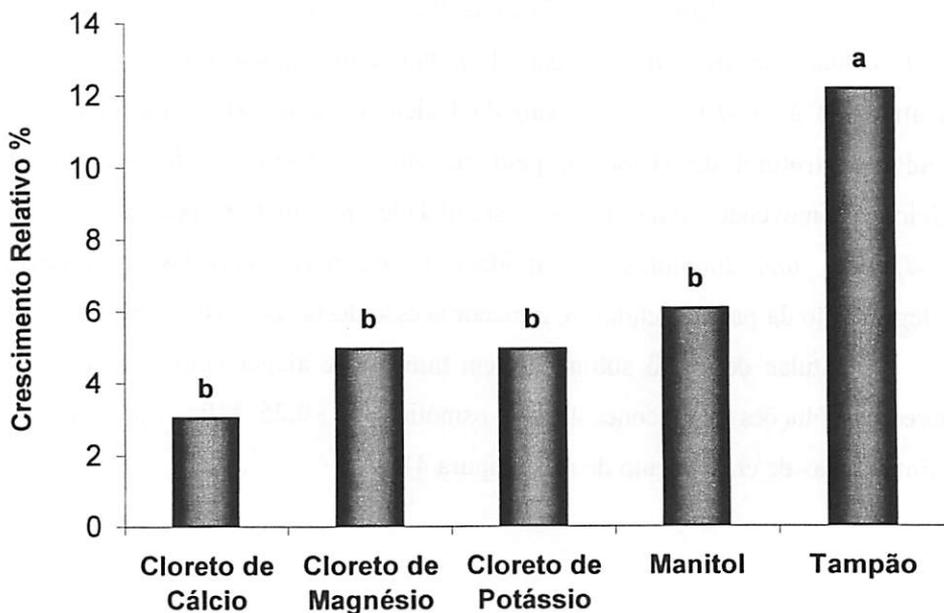


Figura 4 – Crescimento relativo de raízes seminais durante o alagamento da variedade Saracura em diferentes soluções de tampões. Colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (Scott-Knott 5%).

De maneira semelhante à presença destas soluções embebendo os papéis de germinação, raízes de plântulas em tampão de alagamento e tampão de alagamento acrescido de solução de cloreto de Cálcio apresentaram as maiores e menores taxas de crescimento relativo, respectivamente. Estes resultados demonstram que a manutenção da sobrevivência das plântulas à hipoxia pelo Cálcio ou por soluções com baixa concentração osmótica, provavelmente esteja associada à inibição do seu crescimento. Neste caso, esta inibição leva a um crescimento menor das plântulas e a uma economia de energia, esqueletos de carbono, levando a uma maior longevidade quando submetidas ao estresse hipóxico. Pode-se observar, quando contrastados, os resultados do comprimento

de raízes seminais após seis dias de alagamento com os resultados do número de plântulas sobreviventes (Figura 5).

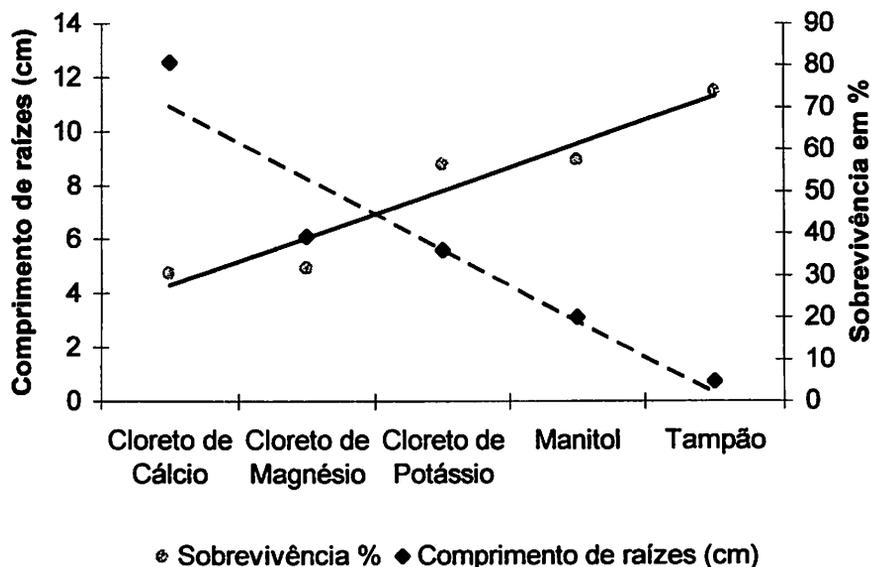


Figura 5 – Comprimento de raízes seminais e sobrevivência, com as respectivas linhas de tendências, após o alagamento da variedade Saracura em diferentes soluções de tampões.

Ficando evidente a participação do componente osmótico durante a germinação de sementes de milho com reflexos na redução do crescimento e no aumento na tolerância das plântulas à hipoxia, foram testadas soluções de manitol com diferentes concentrações osmóticas sobre a germinação. Verificou-se que a partição de matéria seca da cariópse para raiz e coleótilo decresceu à medida em que se aumentou a pressão osmótica da solução de germinação (Figura 6).

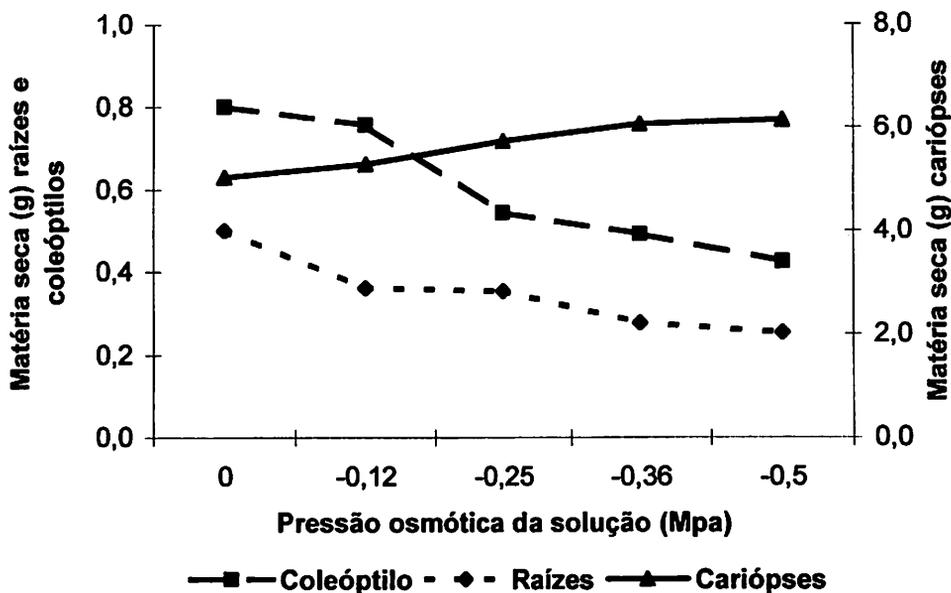


Figura 6 – Matéria seca (g) de raízes, coleóptilos e cariópses após 4 dias de germinação.

A partir destes resultados foram testados também soluções de manitol com diferentes concentrações osmóticas tanto nas soluções de germinação quanto nos tampões de alagamento (figura 7). Observou-se que, à medida em que se diminuiu o potencial osmótico da solução de embebição do papel de germinação de zero para $-0,5$ MPa, o comprimento da raiz sofreu uma redução quase que linearmente, enquanto o crescimento da plântula como um todo (raiz seminal e coleóptilo) sofreu os maiores decréscimos (Figura 8).

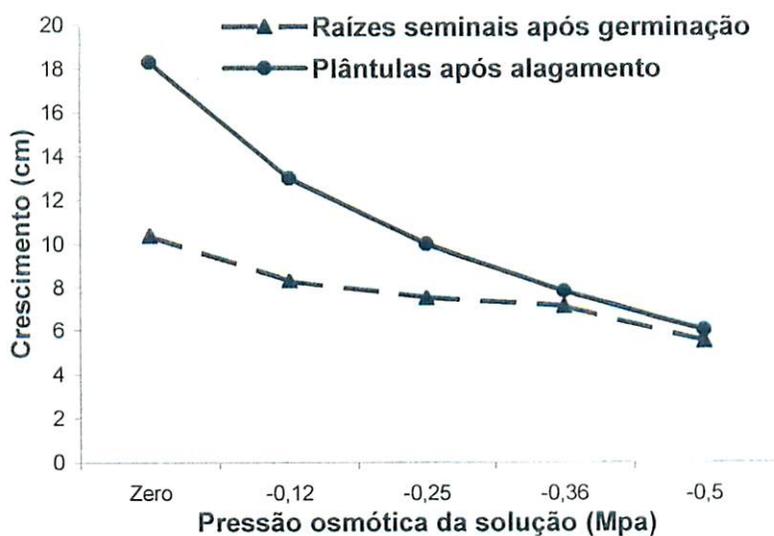


Figura 7 – Crescimento de raízes seminais após quatro dias de germinação e de plântulas após quatro dias de alagamento.

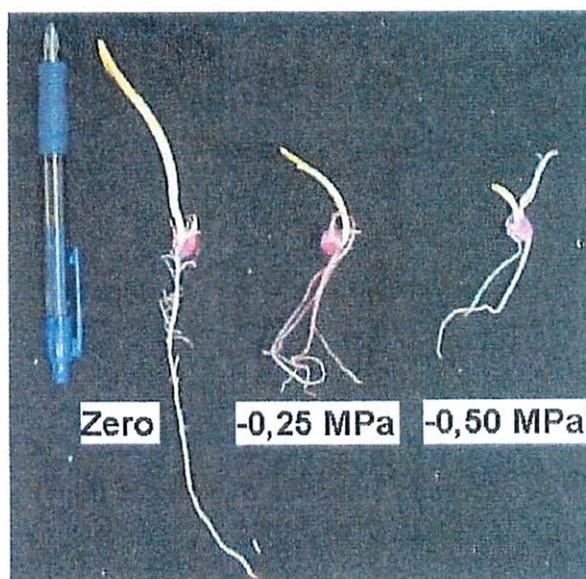


Figura 8 – Crescimento de plântulas após germinação em diferentes pressões osmóticas. Universidade Federal de Lavras, 2000.

Estes resultados evidenciam que a parte aérea é de alguma forma, mais sensível à diminuição da pressão osmótica da solução do que as raízes. Esta mesma relação inversamente proporcional entre crescimento e concentração osmótica da solução foi observada também para a matéria seca das plântulas após o final do período de alagamento de quatro dias (Figura 9). Por outro lado, a perda de matéria seca das cariópses diminuiu com o aumento da osmoconcentração da solução. Estes resultados demonstram que, sob menores potenciais de pressão osmótica, a degradação e/ou mobilização de substâncias de reservas da cariópse para o embrião e posteriormente para a plântula fica severamente limitada nos períodos de germinação (Figura 6) e de estresse hipóxico (Figura 10).

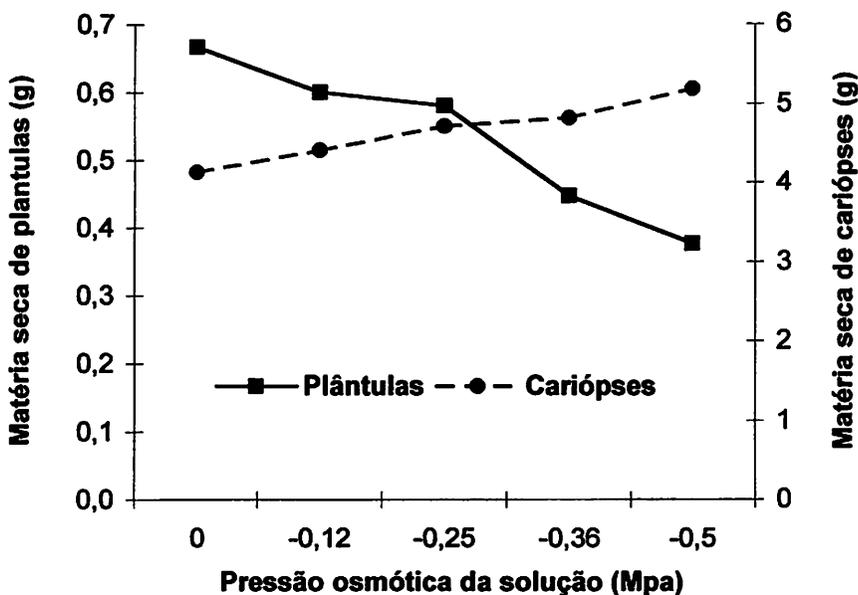


Figura 9 – Peso de MS de plântulas e cariópses após alagamento de 4 dias.

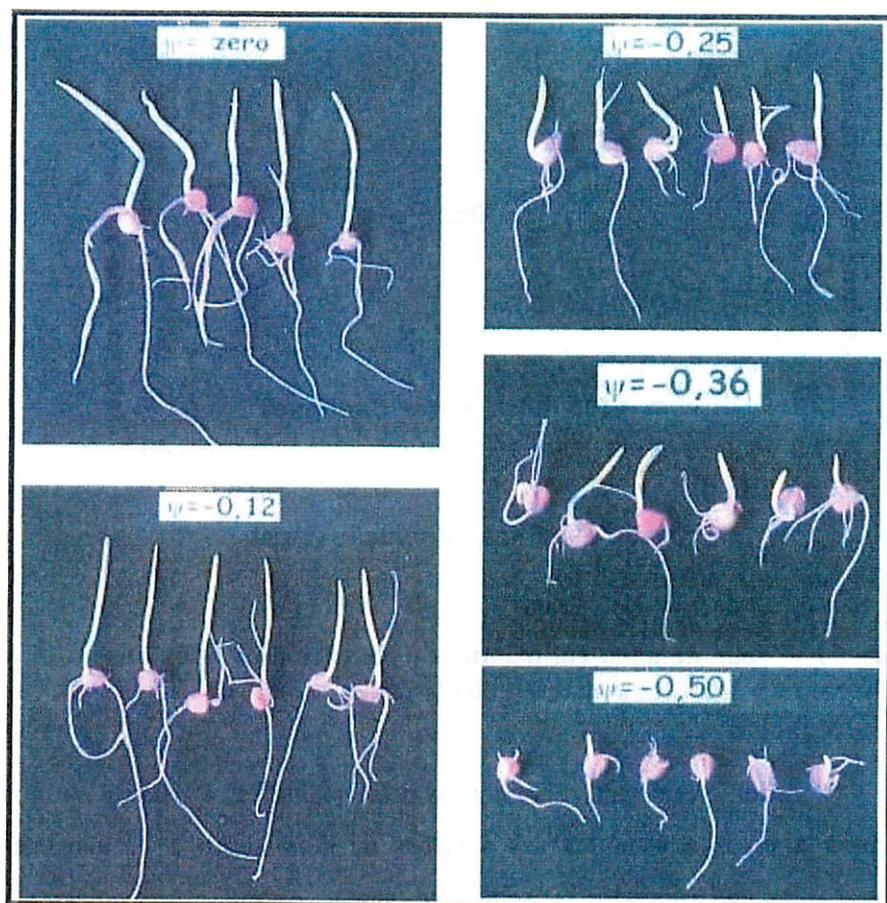


Figura 10 – Plântulas após quatro dias de hipoxia em diferentes pressões osmóticas na tampão de alagamento. Universidade Federal de Lavras, 2000.

A análise do teor de água nas plântulas e cariópses revelou uma queda com a diminuição da concentração osmótica da solução (Figura 11), o que indica que o ajuste osmótico exigido implica numa menor disponibilidade de água nas células com as implicações envolvidas nas remobilizações de reservas da semente para a plântula, bem como para obtenção de pressão de parede necessária para o alongamento celular.

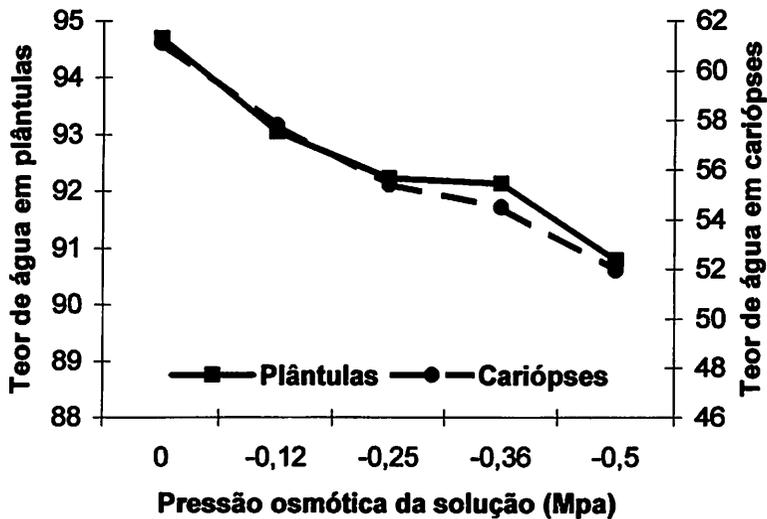


Figura 11 – Teor de água em plântulas e em cariópseis após quatro dias de alagamento em soluções com diferentes pressões osmóticas de Manitol.

O menor crescimento apresentado pelas plântulas, à medida em que se aumentou a pressão osmótica das soluções de germinação e de alagamento, expressa uma correspondência com uma menor degradação fisiológica das plântulas quando submetidas ao processo de hipoxia, uma vez que o número de plântulas, apresentando sintomas, diminuiu à medida à proporção em que houve aumento nas pressões osmóticas das soluções de germinação e alagamento (Figura 12).

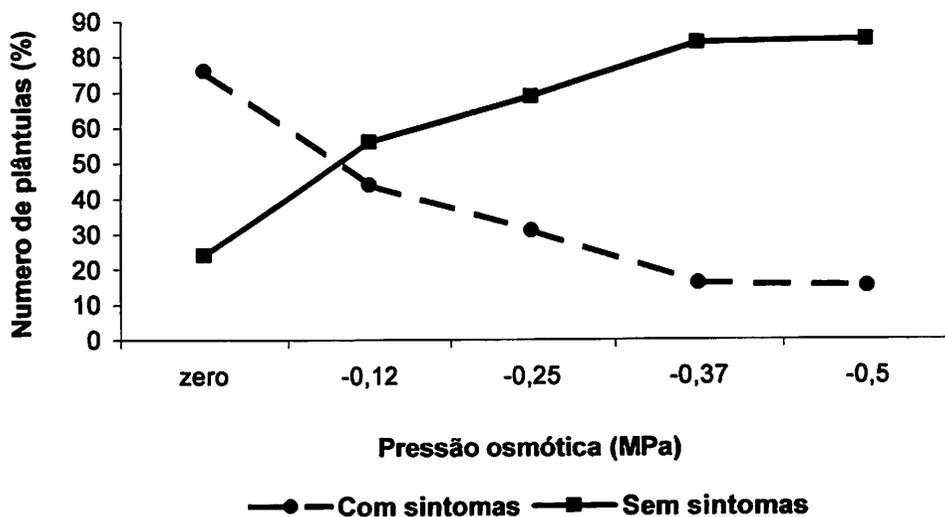


Figura 12 – Presença ou ausência de sintomas em plântulas após quatro dias de alagamento em soluções com diferentes pressões osmóticas de Manitol.

Em ensaios anteriores de alagamento de plântulas, se obteve o comportamento em relação à sobrevivência através da avaliação do número de plantulas vivas após o transplante para vermiculita. Observou-se que em um processo hipóxico de 4 dias com uma pressão osmótica no tampão de alagamento de $-0,25$ MPa, ocorre uma redução no crescimento das plântulas e, um significativo aumento na sobrevivência das plântulas em relação ao controle (Figura 3).

Nos ensaios de hipoxia, realizados com o aumento gradativo da pressão osmótica dos tampões de alagamento, as avaliações foram realizadas sobre o número de plântulas com presença ou ausência dos sintomas característicos, expressados nos coleóptilos (Figura 12). Observou-se que as cariopses em hipoxia nos tampões de alagamento com pressões osmóticas a partir de $-0,37$

MPa, apresentam uma redução do crescimento radicular, proporcional ao aumento da pressão osmótica do tampão e um crescimento nulo ou incipiente da parte aérea. Desta forma não é possível, por este método, avaliar em pressões osmóticas mais elevadas a extensão dos danos fisiológicos e, se a redução no crescimento implica em um aumento na sobrevivência das plântulas transplantadas após o processo de hipoxia. Sugere-se que a realização de novos trabalhos com tampões de alagamento com pressões osmóticas iguais ou superiores a $-0,37$ MPa, que contemplem avaliações da sobrevivência após o processo de hipoxia, possam indicar se uma maior pressão osmótica resulta em uma maior sobrevivência das plântulas transplantadas após o processo hipóxico.

6 CONCLUSÕES

O Cálcio possui função fisiológica específica, pois apresentou diferença significativa no aumento da sobrevivência das plântulas alagadas em relação a todos os demais cátions.

O aumento da pressão osmótica do tampão de alagamento elevou de forma significativa, em relação ao controle, a sobrevivência das plântulas submetidas ao processo hipóxico.

A elevação gradativa da pressão osmótica nos tampões de alagamento interfere de forma proporcional na mobilização de reservas das cariópses para os demais órgãos, reduz o crescimento das plântulas e o número de plântulas com sintomas característicos do processo de hipoxia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AURISANO, N.; BERTANI, A; REGGIANI, R. Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acid metabolism in rice roots under anoxia. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n.8, p. 1525-1529, Dec. 1995.
- BURNS, J.K.; PRESSEY, R. Ca^{2+} in cell walls of ripening tomato and peach. **Journal of th American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n.5, p. 783-787, Sept. 1987.
- CONWAY, W.S.; SAMS C.E.; WATADA, A.E. Relationship total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. **Acta Horticulturae**, Wageningen, 398, p 31-39, 1995.
- DANTAS, B.F. **Efeito do Cálcio no desenvolvimento e 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, 1999, 37 p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 223-250, 1997.
- DREW, M.C.; JACKSON M.B.; GIFFARDS, S. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchima) in roots may be adaptative responses to flooding in *Zea mays* L. New York, **Planta**. Berlim, v. 147, n. 1, p. 83-88, Oct. 1979.
- FELLE, H.H.; HEPLER, P.K. The cytosolic Ca^{+2} concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca^{+2} – selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, n.1, p. 39-45, May 1997.
- HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Inductions of enzymes associated with lysigenous aerenchima formation in roots of *Zea Mays* L. during hypoxia and nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 3, p. 881-865, July 1994.

- HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Transduction of ethylene signal required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchima formation during hypoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 463-472, Oct. 1996.
- HOLE, D.J.; COBB, B.G.; HOLE, P.S.; DREW, M.C. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea Mays* L. following low-oxygen (hypoxic) acclimation. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.1, p. 213-218, May 1992.
- JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v.7, n.2, p. 153-164, Feb. 1984.
- JUSTIN, S.H.F.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of root and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, Oxford, v. 106, n. 3, p. 465-495, July 1987.
- KAWASE, M. Effect of ethylene on aerenchima development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 68, n. 5, p. 651-658, May/June 1981.
- KELLEY, P.M.; FREELING, M. Anaerobic expression of maize fructose-1-6-diphosphate aldolase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 22, p. 14180-14183, Nov. 1984.
- KELLEY, P.M.; TOLAN, D.R. The complete amino acid sequence for the anaerobically induced aldolase from maize derived from cDNA clones. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 2, p. 1076-1080, Dec. 1986.
- KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; ASAKA, T.; MATOH, T. Borate-Rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca²⁺ retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n.1, p. 199-203, Jan. 1999
- KOZLOWSKI, T.T; PALLARDY, S.G. Effect of flooding on water carbohydrate and mineral relation. In: Kozlowiski, T.T. **Flooding and Plant Growth**. New York: Academic Press, 1984. , p. 165-188.
- LAZLO, A; LAWRENCE, P.S. Parallel induction and synthesis of PDC and ADH in anoxic maize roots. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 192, p. 110-117, 1983.

- LEMKE-KEYES C.A; SACHS, M.M. Genetic variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germoplasm. *Maydica*, Bergamo, v.34, p. 329-337, 1989.
- LIMA, L.C. **O Tecido esponjoso em manga "Tommy Atkins": Transformações químicas e bioquímicas no mesocarpo durante o armazenamento.** Lavras: UFLA, 1997. 151 p. (Tese – Doutorado em Ciência do Alimento).
- PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.; LOPES, M.A; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES P.E.O; PACHECO, C.A; SOUZA, I.RP.; MEIRELES, W.; CORREA, L.A Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54-Saracura. I Reunião de melhoristas de milho na América Latina, 1997, Colômbia **Anais**.
- RUSSEL, D. A.; SACHS, M.M. The maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 229, p. 219-228 1991.
- SAAB, I.N.; SACHS, M.M. A flooding-induced xyloglucan endo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n.1, p. 385-391, Sept. 1996.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 161, p. 111-115, 1978.
- SACHS, M.M.; FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic protein of maize. **Cell**, Cambridge, v.20, p. 761-767, July. 1980.
- SAFTNER, R. A.; CONWAY, W.S. Effect of postharvest calcium chloride treatments on tissue water relations, cell wall calcium levels and postharvest life of "Golden delicious" apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, n. 5, p. 893-897, Sept. 1998.
- SALUNKE, D.K.; BOLIN, H. R.; REDDY, N.R. **Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables; fresh fruits and vegetables.** 2.ed. Boston: CRC Press, 1991. 323 p.
- SHEEN, J. Ca²⁺ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plant. **Science**, Washington, v. 274, n. 5294, p. 1900-1902, Dec. 1996.

- SIDDIQUI, S.; BANGERTH, F. The effect of calcium infiltration on structural changes in cell walls of stored apples. **Journal of Horticultural Science**, Kent, v. 71, n.5, p. 703-708, Sept. 1996.
- SOUZA, A.L.B. **Resistência pós colheita do pêsego (Prunus persica L. Batsh cv. Biuti) a Monilinia fructicola: indução de respostas bioquímicas pela aplicação do CaCl₂ no local da injúria.** Lavras: UFLA, 1998. 161 p.
- SPRINGER B.; WERR, W.; STARLINGER, P.; BENNET, D. C.; ZOKOLICA, M.; FREELING, M. The shrunken gene on chromosome 9 of Zea mays L. is expressed in various plant tissue and encodes an anaerobic protein. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 205, p. 461-468, 1986.
- SUBBAIAH, C.C.; ZHANG, J.; SACHS, M.M. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 369-376, May 1994.
- VARTAPETIAN B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 3-20, 1997. Supplement A.
- VITORINO P.F.P.G. **Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura BR 154 a hipoxia, efeito da Cálcio e modificações da parede celular.** Lavras: UFLA 1999. 49 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal).