

**CARACTERIZAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA
VARIEDADE DE MILHO SARACURA-BR 154
A HIPOXIA, EFEITO DO CÁLCIO E
MODIFICAÇÕES DE PAREDE CELULAR**

**PATRÍCIA DE FÁTIMA PEREIRA GOULART
VITORINO**

PATRÍCIA DE FÁTIMA PEREIRA GOULART VITORINO

**CARACTERIZAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA VARIEDADE DE MILHO
SARACURA-BR 154 A HIPOXIA, EFEITO DO CÁLCIO E
MODIFICAÇÕES DE PAREDE CELULAR.**

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

Orientador:

Prof. José Donizeti Alves

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999

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

Vitorino, Patrícia de Fátima Pereira Goulart

Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações de parede celular / Patrícia de Fátima Pereira Goulart Vitorino. – Lavras : UFLA, 1999.

49 p. : il.

Orientador: José Donizeti Alves.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho – Zea mays. 2. Hipoxia. 3. Cálcio. 4. Parede celular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.15

PATRÍCIA DE FÁTIMA PEREIRA GOULART VITORINO

**CARACTERIZAÇÃO DA TOLERÂNCIA DA VARIEDADE DE MILHO
SARACURA-BR 154 A HIPOXIA, EFEITO DO CÁLCIO E
MODIFICAÇÕES DE PAREDE CELULAR**

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

APROVADA em 26 de abril de 1999

Prof. Dr. Luís Carlos de Oliveira Lima UFLA

Dr. Paulo César Magalhães CNPMS /EMBRAPA


Prof. Dr. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

A Deus,
pela oportunidade de vida e de trabalho,
Aos meus pais Augusto, e Adair,
Aos meus segundos pais, Lourdes e
Angelo Vitorino (*in memoriam*),
OFEREÇO.

Ao meu marido, Antonio Carlos,
que com seu amor, amizade, cumplicidade
e companheirismo tem preenchido
os dias de minha vida,
Aos meus filhos Leticia e Gabriel,
duas estrelas que o céu me confiou
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), à FAPEMIG e ao CNPq, pela oportunidade de realização do curso e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José Donizeti Alves, pela orientação, por sua presença amiga sempre constante, por seu exemplo de profissionalismo e responsabilidade e por permitir-me compartilhar de seus conhecimentos em todos os momentos deste trabalho .

Ao Dr. Marcelo Murad Magalhães, por sua amizade, co-orientação, e ajuda valiosa .

Ao Prof. Luiz Carlos de Oliveira Lima, pela orientação e sugestões imprescindíveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira, pela amizade, co-orientação, conhecimentos transmitidos e convivência durante este período de minha vida.

Ao pesquisador Paulo César Magalhães CNPMS - Sete Lagoas por suas sugestões e participação no comitê de orientação.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, pelo fornecimento das sementes de milho utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Marcos S. Buckeridge, Instituto de Botânica / São Paulo, por sua valiosa colaboração nas análises de FTIR.

Aos graduandos Marina Seiffert e Dárlan Einstein, pela amizade, disposição e alegre colaboração, tomando melhores todas as etapas deste trabalho.

Às colegas de curso Bárbara França Dantas, por sua amizade, colaboração e valiosas sugestões e Simone Alves Lobo Leite por sua colaboração e presença calma, amiga em vários momentos, e às graduandas Carol e Bianca por sua ajuda no laboratório.

Ao Tanhan, pela alegria constante e valiosa colaboração no laboratório; Izonel, pelo atencioso atendimento nos assuntos burocráticos,

Evaristo Guerra, por sua prestimosa colaboração, e aos funcionários Lena, Joel, Odorêncio e Mauro, pela colaboração.

Aos colegas de curso Cláudia Rita, Paulo Arthur, Márcia Débora, Alessandro, Ruppert, Nair, Dária, Silvana, Eva, Guilherme, Ana Hortência e demais colegas do setor de Fisiologia Vegetal, pela convivência amiga.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos ministrados.

À Nega, pela amizade, apoio e colaboração, mantendo meu lar sempre em ordem e funcionando durante minhas ausências.

Aos meus familiares, meus pais, minha sogra, irmã, irmãos, cunhadas, cunhados, tios e tias, meus amigos de Lavras e de Dourados-MS, pelo incentivo, e fé sempre constante em minha capacidade de trabalho.

Aos meus filhos, Leticia, e Gabriel, por seu amor, presença amiga, carinhosa e alegre, incentivando-me e ajudando-me em todos os momentos .

Ao meu marido, Antônio Carlos, por seu amor, confiança, colaboração, valiosas sugestões profissionais, sua presença constante em todos os momentos deste trabalho me apoiando, incentivando, ajudando.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Acima de tudo a Deus, por permitir mais esta realização em minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Metabolismo celular sob deficiência de oxigênio	3
2.2 Influência do cálcio na estabilidade da parede celular	5
2.3 Aspectos gerais sobre a parede celular	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Material utilizado	9
3.2 Indução do estresse	9
3.3 Avaliação do pH do tampão de alagamento, do vigor e sobrevivência das plantas	10
3.4 Análise da parede celular	11
3.4.1 Extração	11
3.4.2 Cromatografia gélica	12
3.4.3 Cromatografia gasosa	13
3.4.4 Espectro de infravermelho com transformação de dados pela série de Fourier (FTIR)	14
3.5 Envolvimento do cálcio na tolerância das plantas de milho ao estresse de oxigênio	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Tolerância do Saracura-BR 154 à baixa disponibilidade de oxigênio no meio	17
4.2 Cromatografia gélica	21
4.3 Cromatografia gasosa	27
4.4 Espectro de infravermelho com transformação dos dados pela série de Fourier (FTIR)	32

4.5 Efeito do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho submetidas à deficiência de oxigênio no meio	34
5 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

RESUMO

VITORINO, Patricia de Fátima Pereira Goulart. Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações da parede celular. Lavras: UFLA, 1999. 49p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal)¹

Este trabalho foi conduzido na Universidade Federal de Lavras, MG, objetivando avaliar a tolerância da variedade de milho Saracura-BR 154 em diferentes períodos sob baixa disponibilidade de oxigênio, assim como o efeito do cálcio no prolongamento desta tolerância e as alterações na composição da parede celular em plântulas submetidas à hipoxia. Cariópses das variedades de milho Saracura-BR 154 e BR 107 (tolerante e sensível a deficiência de oxigênio no meio, respectivamente) foram colocadas para germinar, e, posteriormente, submetidas a tratamento sob condições de hipoxia. Do material obtido, uma parte foi levada para recuperação em caixas com vermiculita e destinada a avaliação do vigor e sobrevivência, e a outra foi utilizada nas análises de parede celular. A sobrevivência das plântulas foi avaliada por um período de cinco dias, observando-se a formação e enverdecimento de folhas. Extraíu-se a parede celular de segmentos do mesocótilo com diferentes intensidades de danos: tecido normal, translúcido (lise celular) e com o aparecimento de uma constrição. O material de parede celular fracionado em substâncias pécticas, hemicelulose 2M e 4M foi submetido às cromatografias gélica e gasosa. A análise de FTIR foi realizada em material liofilizado e triturado misturado com KBr. Foram estudados os efeitos de diferentes concentrações (0; 0,02; 0,26; 0,51; 0,76 e 1,0%), e formas de aplicação de CaCl_2 (aplicado somente no papel de germinação; somente no tampão de alagamento; no papel de germinação e no tampão de alagamento e ausência de cálcio) na sobrevivência de plântulas de milho. Comparativamente à BR-107, a variedade Saracura-BR154 apresentou-se altamente tolerante à hipoxia, comprovando o seu desempenho no campo, durante o processo de melhoramento genético. A hipoxia, em períodos prolongados, causou uma desestruturação da parede celular, formando, na região do mesocótilo, uma intensa lise de células que, em estágios mais avançados, levou à formação de uma constrição naquela região, causando o tombamento e morte das plantas. Estas modificações na parede celular foram confirmadas pelas cromatografias gélica e gasosa e pela análise de FTIR. O fornecimento exógeno de cálcio, prolongou a sobrevivência de ambas as variedades durante o período

¹ Orientador: José Donizeti Alves - UFLA. Membros da Banca: Luis Carlos de Oliveira Lima (UFLA), Paulo César Magalhães (CNPMS).

de alagamento, retardando as modificações na parede celular, e por conseguinte, os danos descritos anteriormente.

ABSTRACT

VITORINO, Patricia de Fátima Pereira Goulart. **Characterization of tolerance of maize Saracura-BR 154 variety to hipoxia, calcium effect and cell wall modifications.** Lavras: UFLA, 1999. 49p. (Dissertation - Master in Agronomy - Plant Physiology)*

This research was conducted at Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, to evaluate the maize Saracura-BR 154 variety tolerance in different periods under low oxygen availability, as well as, the calcium effect in extending this tolerance and the alterations in the cell wall composition in plantlets submitted to hypoxia. Cariopsis from maize variety Saracura-BR 154 and BR 107 (tolerant and sensitive to low oxygen levels), respectively were set to germinate and latter submitted to hypoxia conditions. Part of this material was used for recovery in boxes with vermiculite and it was evaluated for vigor and survival, and the other half used for cell wall analysis. The plantlet survival was evaluated during five days, it was observed the number and greening of the leaves. Cell wall was obtained from mesocotyl segments, with different damage intensities: normal tissue, translucent (cellular lysis) and the constriction appearing. The fractionated cell wall material in pectic substances, hemicelulosis 2 and 4 M was analyzed by gel filtration and gas chromatography. The FTIR profile was made in liophylized material, triturated and mixed with KBr. In addition, it was evaluated different concentrations (0; 0.02; 0.26; 0.51; 0.76 and 1.0%), and different mode of CaCl₂ application (only in germination paper; only in flooding buffer; in germination paper and flooding and without CaCl₂) in maize plantlet survival. Comparatively to BR 107, the Saracura-BR 154 variety showed highly tolerant to hypoxia, confirming its field performance during the breeding program. The hypoxia during long period caused cell wall desestruturation, causing in mesocotyl region a intense cell lysis, that in and plant death. These cell wall modifications were confirmed by gelic and gaseous chromatography and FTIR spectrum. The exogenous calcium prolonged the survival in both varieties during the flooding period, retarding the cell wall modifications and damages cited above.

* Adviser: José Donizeti Alves - UFLA. Guidance committee: Luis Carlos de Oliveira Lima (UFLA), Paulo César Magalhães (CNPMS).

1 INTRODUÇÃO

A produtividade média brasileira de milho é de 2709kg/ha (Milho...,1999). Em áreas de solo encharcado e conseqüente baixa disponibilidade de oxigênio, tanto a produtividade como o crescimento dessa cultura, de maneira geral, são fortemente afetados (Rizzini, 1976). Essa característica encontrada em cerca de 28 milhões de hectares de várzeas com aptidão para a utilização agrícola no Brasil, tem restringido o cultivo do milho (Silva, 1984).

Estas áreas, apesar de possuírem de média a alta fertilidade, estão sujeitas a períodos intermitentes de encharcamento do solo por alto regime pluvial, por inundação de cursos de água ou por deficiência de drenagem (Lopes, Parentoni e Magnavaca, 1988). Em ambientes onde a resistência difusiva da maioria dos gases é aproximadamente 10.000 vezes maior que a do ar, a respiração das plantas e dos microorganismos, consumindo o oxigênio remanescente, cria condições de hipoxia ou de anoxia (Armstrong, Brandle e Jackson, 1994), altamente desfavoráveis ao desenvolvimento das culturas. Dentre as causas do insucesso da cultura do milho em solos com períodos intermitentes de excesso de água, destaca-se a sensibilidade da espécie a esse tipo de estresse, como decorrência da ausência de mecanismos de tolerância ou resistência. Tem-se verificado, entretanto, que algumas variedades como a B73Ht cultivada no estado de Illinois/USA, normalmente conseguem sobreviver sob estresse anaeróbico por um período de três dias (Lemke-Keyes e Sachs, 1989).

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) desenvolveu o Saracura-BR 154, uma variedade de milho de polinização livre que, após nove ciclos de seleção massal sob condições de excesso de umidade no solo, revelou-se como uma das mais

adequadas para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento. Nessas condições, do ciclo um ao nove, o peso da espiga aumentou em 25% enquanto que sob condição normal de água no solo, o aumento verificado foi de apenas 14% (Parentonni et al., 1996). Como respostas indiretas à seleção para a tolerância ao encharcamento, observaram-se tendências a aumentar a altura da planta e espiga, à prolificidade e a diminuir o quebramento do colmo. A produção comercial do Saracura-BR 154 em áreas sujeitas ao encharcamento temporário iniciou-se no verão 1997/98.

Ainda que a variedade Saracura-BR 154 seja recomendada para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento, não foram, até o momento, estudados os mecanismos que conferem a esta variedade o alto grau de tolerância a deficiência de oxigênio no solo.

Alguns relatos encontrados na literatura mencionam que variedades de milho suscetíveis ao alagamento apresentam um acentuado amolecimento na região do mesocótilo da plântula em relação às variedades tolerantes (Saab e Sachs, 1996). Uma das causas para esse enfraquecimento poderia ser alterações na composição da parede celular, como acontece no amadurecimento de frutos (Huysamer, Greve e Labavitch, 1997). Apesar disso, as pesquisas enfocando alagamento e variações na composição da parede são praticamente inexistentes.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a tolerância da variedade de milho Saracura-BR154 em diferentes períodos sob baixa disponibilidade de oxigênio, o efeito do cálcio no prolongamento dessa tolerância, bem como as alterações na composição da parede celular em plântulas submetidas à hipoxia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo celular sob deficiência de oxigênio:

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). Como essas alterações são reguladas a nível de transcrição e tradução (Sachs, 1998), a baixa disponibilidade de oxigênio induz à expressão dos genes que codificam para os polipeptídeos conhecidos como anaeróbicos (ANPs), tais como: álcool desidrogenase (Sachs e Freeling, 1978), aldolase (Kelley e Tolan, 1986), sacarose sintetase (Springer et al., 1986), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Russell e Sachs, 1991), enolase (Lal et al. 1998), glucose-6-fosfato isomerase (Kelley e Freeling, 1984) e piruvato descarboxilase (Lazlo e Lawrence, 1983), entre outros.

Nas primeiras duas horas de estresse anaeróbico, ocorre forte repressão da síntese de proteínas aeróbicas acompanhada de progressiva indução da síntese de 20 ANPs em raízes primárias de plântulas de milho (Sachs, Freeling e Okimoto, 1980). A maioria dos ANPs tem sido identificada como sendo enzimas envolvidas na glicólise ou no metabolismo dos açúcares-fosfato (Germain et al., 1997; Sachs et al., 1996; Menezes Neto, Alves e Oliveira, 1995). Entretanto, tem sido observado que o gene que codifica para uma homóloga da xyloglucana *endotransglicosidase*, uma enzima aparentemente envolvida com a formação de aerênquimas em raízes de milho, também é induzido pelo déficit de oxigênio (Peschke e Sachs, 1994).

Dentre os ANPs, destaca-se a importância da enzima álcool desidrogenase (ADH) no aumento da tolerância de plantas de milho a anoxia

(Hole et al., 1992). Russell e Sachs (1992) observaram que o nível do mRNA-ADH aumentou 10 vezes sob anaerobiose, enquanto que a síntese *in vivo* desta proteína, em relação à síntese de proteína total, aumentou em um número muito maior, indicando um controle mais efetivo no processo de tradução. Esses resultados mostram que a ausência de oxigênio leva a um déficit de energia na célula, pela limitada fosforilação oxidativa do ADP, em função do desvio da rota oxidativa para a rota fermentativa. Neste caso, a produção líquida de ATP decresce de 36 na primeira via para 2 na segunda via (Vartapetian e Jackson, 1997; Koslowski, 1997).

A presença dos 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), raízes adventícias (Pezeshki, 1994; Osundina, 1998) e hipertrofia de lenticelas (Tang e Kozlowski, 1984; Siebel, VanWijk e Blom 1998; Crawford e James, 1998). A formação dos aerênquimas, associada ou não com as lenticelas, permite a difusão do oxigênio da parte aérea até o sistema radicular, levando a aeração ao meio intracelular das raízes, ainda que este órgão permaneça em um meio deficiente em oxigênio (Drew, 1997). Esse tipo de adaptação tem prolongado a sobrevivência das plantas, principalmente aquelas de rápido crescimento, como o arroz (Kende, Knaap e Cho, 1998), *Echinochloa phyllopogon* (Fox, Kennedy e Rumpho, 1994) e *Lotus sp* (Crawford e James, 1998), em ambientes alagados. O aparecimento de raízes adventícias, por sua vez, permite a manutenção de uma atividade metabólica oxidativa na região mais superficial do sistema radicular, uma vez que esta camada apresenta-se com níveis mais elevados de oxigênio (Pezeshki, Pardue e DeLaune, 1996)

A formação de aerênquimas tem sido extensivamente estudada em plantas com raízes submersas. 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. Plantas deficientes em nitrogênio e fósforo, cultivadas em ambientes aerados, também formam aerênquimas sob a influência do etileno (He, Morgan e Drew, 1992). Existem fortes evidências de que o rápido aparecimento desses espaços aéreos corticais em raízes esteja associado à indução de enzimas de degradação da parede celular, tais como celulase (He, Drew e Morgan, 1994) e xyloglucanaendotransglicosidase (Saab e Sachs, 1996). Esses últimos autores sugerem que a hipoxia provoca certos “desarranjos” dos componentes da parede celular levando ao amolecimento de plantas de milho na região do mesocótilo, provocados talvez por enzimas que atuam na própria parede celular ou na lamela média. Desta forma, as células sem a devida coesão e com paredes celulares desestruturadas entram em colapso e perdem sua integridade, conforme mostrado por Aurisano, Bertani e Reggiani (1995) em plântulas de arroz. De acordo com os mesmos autores, o complexo cálcio/calmodulina poderia estar envolvido na preservação da integridade da parede celular.

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).

2.2 Influência do cálcio na estabilidade da parede celular

Subbaiah, Zhang e Sachs (1994), estudando o envolvimento do cálcio intracelular mediante o uso de antagonistas do cálcio ou de bloqueadores de canais de cálcio, concluíram que esse elemento exerce importante papel na sobrevivência de plântulas de milho em ambiente anaeróbico. De acordo com

diversos autores, o cálcio estaria atuando como elemento importante na transdução de estímulos externos em respostas metabólicas (Aurisano, Bertani e Reggiani, 1995; Felle e Hepler, 1997; Sheen, 1996; Subbaiah, Zhang e Sachs, 1994 e Subbaiah, Bush e Sachs, 1994). Os dois últimos trabalhos demonstram que, sob anoxia, a mobilização do cálcio de reservatórios intracelulares até o citoplasma induziu a transcrição dos mRNAs *adh1* e *sh1* que, uma vez traduzidos, levaram à síntese das proteínas anaeróbicas álcool desidrogenase e sacarose sintase, respectivamente.

Até o momento, todas as pesquisas têm apontado que o cálcio atua como um mensageiro secundário na percepção de sinais externos ambientais (Subbaiah, 1996). Entretanto, uma série de estudos pós-colheita vêm mostrando 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 caracterização da composição de parede celular em suas frações substâncias pécticas, hemicelulose e α -celulose tem ajudado a explicar, em muitos casos, a causa do amolecimento de frutos.

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 microrganismos (Conway, Sams e Watada, 1995). O modelo mais aceito de ligação do cálcio aos poligalacturonatos é o 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). Em estudos realizados por Kobayashi et al. (1999), verificou-se que, além do borato, o cálcio ligado às ramnogalacturonanas são responsáveis pela estabilização dos polissacarídeos pécticos e, conseqüentemente, da parede celular.

Uma vez que tem sido observado, sob condições de hipoxia e de anoxia, o 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 poderia atuar não somente como mensageiro secundário mas também como um elemento estrutural, durante o período de déficit de oxigênio. Segundo Salunke, Bolin e Reddy (1991), o cálcio, ao se associar com as substâncias pécticas, provoca restrições espaciais a ação de enzimas hidrolíticas. Conway, Sams e Watada (1995), trabalhando com frutos de maçã, mostraram que a aplicação exógena de cálcio inibiu a atividade das enzimas pectina metil esterase e poligalacturonase. Sendo assim, em plantas alagadas o cálcio poderia atuar na estabilidade da parede celular, e através de sua comprovada ação inibitória na atividade de enzimas hidrolíticas, reduzir o acesso ao sítio da hidrólise (Sidiqi e Bangerth, 1996), retardando o aparecimento da lesão no mesocótilo e, com isto, aumentar tolerância ao período de alagamento das plantas.

2.3 Aspectos gerais sobre a parede celular

A parede celular dos vegetais é o componente mais resistente dos tecidos, consistindo de microfibrilas de celulose embebidas em matriz polissacarídica flexível, composta de substâncias pécticas, hemiceluloses e proteínas. As células são mantidas unidas pela lamela média, constituída principalmente por substâncias pécticas que fornecem a coesão necessária para manter a unidade estrutural da parede celular (Brett e Waldron, 1990).

Segundo Carpita (1998), a parede celular é um compartimento dinâmico que sofre mudanças no decorrer da vida da célula. A parede celular primária é gerada durante a divisão celular e aumenta rapidamente sua área de superfície durante a expansão celular. A lamela média é a interface entre a parede celular

primária e as células vizinhas. Finalmente, por diferenciação, várias células elaboram, no interior da parede celular primária, a parede celular secundária, construindo uma complexa estrutura compatível com as funções da célula. Alguns tipos de células possuem, então, a parede celular primária e uma distinta parede celular secundária. Nas paredes celulares primárias existem proporções semelhantes de pectinas, hemiceluloses e celulose. De modo simplificado, a celulose tem a função de conferir rigidez e resistência ao cisalhamento, enquanto que as hemiceluloses e as substâncias pécnicas conferem plasticidade e elasticidade (Taiz e Zeiger, 1991).

A estrutura química das paredes celulares de gramíneas difere de todas as outras espécies de plantas floríferas, em diversos pontos: no complexo dos glucanos que se entrelaçam e nas microfibrilas de celulose que se entrecruzam formando uma forte estrutura; na natureza da matriz gélica ao redor desta estrutura; no tipo de substâncias aromáticas e proteínas estruturais que se ligam covalentemente às paredes primárias e secundárias (Carpita, 1996).

Em gramíneas, as pectinas constituem uma pequena porção da parede celular e o seu papel é substituído funcionalmente pelo ácido glucosilurônico dos glucoarabinoxilanos (Kim e Carpita, 1992).

Estudando paredes celulares de coleóptilos de milho, Inouhe e Nevins (1997) observaram que elas são constituídas predominantemente de arabinose, xilose e glicose como açúcares neutros de polissacarídeos não celulósicos. Destes açúcares, a glicose representou o maior componente, tanto de glucanos celulósicos como não celulósicos. A medida em que aumentou a idade dos coleóptilos, a proporção de glicose teve um aumento enquanto os níveis de arabinose e xilose decresceram. Entretanto, apesar da composição básica da parede celular de milho ser relativamente conhecida, as modificações causadas pela hipoxia e ou anoxia são praticamente desconhecidas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material utilizado

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas duas variedades de milho desenvolvidas no CNPMS, Saracura BR-154 e BR 107. A variedade Saracura BR-154 apresenta como característica principal a capacidade de suportar períodos intermitentes de encharcamento do solo e pode ser usado para a produção de grãos, milho verde e forragem. Seu ciclo é precoce, altura de planta por volta de 235 cm, altura de espiga 132 cm, média de produtividade de 5 a 6,5 t/há, ótima resistência ao acamamento e ao quebramento, grãos do tipo semiduro, e de cor laranja. Com relação à variedade BR 107, considerada sensível à deficiência de oxigênio no solo, as características mais importantes são: variedade formada a partir do Composto Flint, Cateto Colômbia, Cateto Sete Lagoas e Mescla Amarela. Apresenta ciclo semi-precoce, e média de produtividade variando de 4 a 5t/ha; apresenta resistência intermediária ao acamamento e ao quebramento, altura da planta de 262 cm, altura da espiga 160 cm, grãos do tipo flint, de cor laranja escura.

3.2 Indução do estresse

Cariópses das variedades de milho Saracura e BR 107 (tolerante e sensível a deficiência de oxigênio no meio, respectivamente), após serem lavadas com Clorox a 0,5% (v/v) por 10 minutos, foram colocadas para germinar em papel de germinação tratado com Captan a 0,5%, por 4 dias, a 27°C, no escuro. Após esse período, quatro rolos de papel de germinação contendo 25 plântulas em cada um foram colocados em recipientes contendo um litro de

tampão de alagamento (5mM Tris-HCl, pH8, 100mg. L⁻¹ de ampicilina) sugerido por Saab e Sachs (1996), ficando os mesmos acondicionados na posição vertical e totalmente submersos. Após o borbulhamento com N₂ (1L min⁻¹) durante 3 minutos a fim de se conseguir uma condição de baixa disponibilidade de oxigênio no meio, os recipientes foram selados e deixados a 28°C no escuro, por diferentes períodos de tempo. Quatro rolos de papel contendo 25 plântulas em cada um permaneceram no germinador como testemunhas. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso num sistema fatorial de 6 X 2 com 4 repetições sendo 6 tempos de hipoxia e duas variedades. Uma parte desse material destinou-se a avaliação do vigor e sobrevivência e outra parte foi utilizada nas análises de parede celular.

3.3 Avaliação do pH do tampão de alagamento, do vigor e sobrevivência das plantas

Após 1, 2, 3, 4, 5, e 6 dias de hipoxia, mediu-se o pH do tampão de alagamento e as plântulas foram transferidas para caixas com vermiculita e mantidas em ambiente com temperatura de 28°C, umidade relativa de, no mínimo, 85% e fotoperíodo de 16 horas com uma intensidade de radiação de 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. A sobrevivência das plântulas foi avaliada após cinco dias, observando-se o lançamento e enverdecimento de folhas .

3.4 Análise da parede celular

3.4.1 Extração

Segmentos do mesocótilo com aparência e consistência distintas (normal, translúcido e constrição), obtidos da região mais proximal (basal) e distal (apical) da cariópse foram separados e congelados em N₂ líquido para análises posteriores.

A parede celular foi extraída segundo a metodologia proposta por Mitcham e McDonald (1992), citados por Lima (1997), com algumas modificações. Aproximadamente 15g de cada porção do mesocótilo foram trituradas em homogeneizador com tampão fosfato 0,1M pH7,5 (15mL) 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 100mL do mesmo tampão sob filtração a vácuo. Adicionaram-se então ao resíduo, 30mL de fenol: ácido acético e água (2:1:1 v/v) mantendo-o em repouso por 20 minutos, após o que, lavou-se novamente o resíduo com 100mL de tampão fosfato. O resíduo foi ressuspensionado em 80mL de dimetil sulfoxido 9:1(v/v), aquecido a 100°C por 30 minutos e mantido durante a noite à temperatura ambiente.

Após homogeneização, filtração e lavagem com cerca de 30mL de tampão acetato a 0,1M pH5,0, seguidas de nova lavagem extensiva com água destilada, o resíduo foi dialisado em membrana de diálise (cut-off 6000 - 8000) por 24 h contra água destilada, seguido de filtração a vácuo. O resíduo contendo material de parede celular (MPC) foi ressuspensionado em uma solução de amiloglucosidase 220mg/100mL (6300 unidades/g) em tampão acetato de sódio pH4,8 e incubado a 40°C por 2 h. Em seguida, a mistura foi lavada com água destilada e filtrada. Este resíduo contendo MPC foi submetido ao teste do iodo

com KI/I_2 para se verificar a ausência de amido. O teste, foi então ressuspenso em 50mL de uma mistura de clorofórmio metanol (1:1 v/v), filtrado a vácuo e lavado com acetona, deixando-o secar ao ambiente, obtendo então o MPC isolado.

Visando a obtenção das frações substâncias pécticas, hemicelulose 2 M e hemicelulose 4 M, foram adicionados ao MPC 25mL de oxalato de amônia 0,5%, deixando-o por 1 h em banho maria a 60°C, com agitação. Após este período centrifugou-se o material a 2000g por 20 minutos, repetindo-se a extração com oxalato de amônia por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados e dialisados por 24 h, seguidos de liofilização por 72 h, originando, então, a fração substâncias pécticas da parede celular.

No precipitado resultante da extração do oxalato foram adicionados 40mL de uma solução de KOH 2 M, permanecendo a mistura em atmosfera de nitrogênio (contendo $NaBH_4$ 100mM) por 12 h. Após a filtração a vácuo, ajustou-se o pH do filtrado para 7,0 a 4°C, com posterior diálise por 24 h e liofilização, originando a fração hemicelulose 2 M.

O resíduo remanescente da filtração foi submetido a uma solução de KOH 4 M, em atmosfera de nitrogênio contendo $NaBH_4$ 100mM por 24 h. Após a filtração a vácuo, o filtrado teve seu pH ajustado para 7,0 com ácido acético e, após diálise e liofilização por 72 h, obteve-se a fração hemicelulose 4 M.

Estas frações de parede celular liofilizadas foram então submetidas a análise cromatográfica.

3.4.2 Cromatografia gélica

A filtração em gel dos poliuronídeos das amostras foi realizada em uma coluna (72 X 1,8cm) de Sephadex G-200 previamente calibrada com dextrose (PM=70.000kDa) e glicose (PM=180,6 Da), com um fluxo ajustado para

23mL/hora. Em seguida a determinação do volume vazio (V_0) com azul de dextran, (2000kDa), frações de 3mg do material de parede celular liofilizado, foram ressuspensas em 2 mL do tampão de eluição (fosfato de sódio 0,1M, pH7,5) e aplicadas na coluna.

Em um coletor de frações BioRad Modelo 2110 coletou-se o volume a cada 2 mL, no qual analisou-se a pectina pelo método colorimétrico do carbazol (Bitter e Muir, 1962). Após cada etapa de fracionamento fez-se a lavagem do sistema permitindo-se a passagem de tampão correspondente a duas vezes o seu volume total.

3.4.3 Cromatografia gasosa

Em frações previamente isoladas de substâncias pécticas, hemicelulose 2 M e 4 M foi conduzida a derivatização dos açúcares neutros, conforme Albersheim et al. (1967).

A hidrólise dos polissacarídeos foi realizada em cada amostra de 3mg com 500 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) a 2 N, contendo 10mg/mL do padrão interno, mioinositol. Os tubos de ensaio com boca rosqueada foram vedados e aquecidos por 1 h a 121°C em block heater (aquecimento a seco). Em seguida, a evaporação do TFA em banho maria a 45°C, adicionaram-se 0,5ml de metanol P.A. que foi também evaporado até a secagem.

A redução dos polissacarídeos foi iniciada pela adição de 0,15mL de hidróxido de amônia a 1N, contendo 10mg de borohidreto de sódio. Após 1h, a temperatura ambiente, o excesso de boridreto de sódio foi retirado com adição de ácido acético com posterior evaporação em banho-maria a 45°C até a secagem.

Após a adição de 0,5mL da mistura de metanol:ácido acético (9:1), permitiu-se a secagem, repetindo-se a operação por quatro vezes quando, então,

adicionaram-se 0,5mL de metanol com posterior secagem. Esta operação foi repetida por mais 3 vezes.

A acetilação dos polissacarídeos foi realizada por 3 h a 121°C mediante o uso de 0,15mL de anidrido acético. Em seguida ao esfriamento e secagem em banho-maria a 45°C, adicionaram-se 0,5 ml de metanol, após o quê o material, foi seco e a operação repetida por mais duas vezes.

As amostras assim derivatizadas foram diluídas em 200µL de acetona e injetadas em cromatógrafo a gás Varian (série 3000) modelo 3300 acoplado a Integrador Intralab Mod 4290, com detector de ionização de chama. Utilizaram-se como padrões, rhamnose (Rha), fucose (Fuc), arabinose (Ara), xilose (xil), manose (Man), galactose (Gal), glicose (Gli) e mioinositol, sendo este último o padrão interno e todos os açúcares na concentração de 1g.L⁻¹. Foi utilizada uma coluna capilar OV-DB 225 com 0,25mm de diâmetro e 25m de comprimento e nitrogênio como gás de arraste.

Utilizou-se sensibilidade 10⁻¹¹ e atenuação 8, sendo a pressão e o fluxo 21 psi, e 3,0ml.min⁻¹ para o gás de arraste, 30ml.min⁻¹ para o hidrogênio e 300mL/min⁻¹ para o ar sintético. A temperatura da coluna isocrática foi de 210°C, a do injetor 250°C e a do detetor 300°C.

3.4.4 Espectro de infravermelho com transformação dos dados pela série de Fourier (FTIR)

Os segmentos do mesocótilo das regiões basal e apical e com aspecto normal, translúcido e constrição foram congelados liofilizados e moídos. Aproximadamente 10mg de cada amostra foram misturadas em 100mg de KBr. Em seguida, esta mistura foi triturada, homogeneizada e submetida a leitura na região do infravermelho para obtenção do espectro de FTIR. As interpretações

qualitativas dos diferentes grupos de carboidratos foram realizadas de acordo com McCann et al. (1997).

3.5 Envolvimento do cálcio na tolerância das plantas de milho ao estresse de oxigênio

Para estudar o envolvimento do cálcio na tolerância das plantas de milho ao estresse de oxigênio, foram realizados três experimentos. No primeiro experimento foram estudados diferentes modos de aplicação de CaCl_2 num delineamento em blocos casualizados, no sistema fatorial 3×2 com quatro repetições de 25 plantas por unidade experimental, sendo três modos de aplicação (no papel de germinação, no tampão de alagamento e no papel e no tampão, simultaneamente) na presença e ausência de cálcio. Para tanto, cariópses foram colocadas para germinar em papel de germinação tratado com Captan a 0,5% e, posteriormente umedecido em água ou em solução aquosa de CaCl_2 na concentração de 0,76%. Em seguida, os rolos foram mantidos por 4 dias na posição horizontal a 27°C no escuro. Quatro rolos de papel de germinação, contendo 25 plântulas cada um, foram colocados em recipientes contendo um litro de tampão de alagamento (5mM Tris-HCl, pH8, 100mg.L^{-1} de ampicilina) contendo ou não CaCl_2 a 0,76%, de modo que os rolos ficassem acondicionados na posição vertical e totalmente submersos. Após borbulhamento com N_2 gasoso (1L.min^{-1}), durante 3 minutos, os recipientes foram selados e deixados a 28°C no escuro.

Após 96 horas, as plântulas foram transferidas para caixas com vermiculita e mantidas em ambiente sob temperatura a 28°C , umidade relativa de no mínimo 85% e fotoperíodo de 16 horas. Após cinco dias sob essas condições, a sobrevivência foi avaliada observando-se a formação de novas folhas e enverdecimento das plântulas.

Definido o melhor modo de aplicação, instalou-se um segundo experimento em blocos ao acaso, com o objetivo de avaliar a melhor dose de CaCl_2 em 5 tratamentos correspondentes às doses de 0,02%, 0,256, 0,51 0,76 e 1% e uma variedade, o milho Saracura BR-154, com 4 repetições.

Finalmente, definido o melhor modo de aplicação (no papel de germinação e no tampão de alagamento) e a melhor dose de CaCl_2 (0,76%) montou-se um terceiro experimento visando estudar o efeito do cálcio nas duas variedades em estudo, Saracura BR-154 e BR 107. Este experimento foi montado obedecendo a um esquema fatorial de 6 X 2 X 2, sendo 6 tempos de hipoxia X 2 níveis de cálcio X 2 variedades, com 4 repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tolerância do Saracura-BR 154 à baixa disponibilidade de oxigênio no meio

Ao analisar os resultados do estudo da tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio no meio, observou-se que a variedade Saracura, apresentou índices percentuais de sobrevivência de 15, 43 e 42% superiores ao BR 107, para 1, 2 e 3 dias de hipoxia, respectivamente (Figura 1). Após o quarto dia, as plantas de BR 107 mostraram sua sensibilidade à deficiência de oxigênio no meio, apresentando taxa de sobrevivência próxima de zero. Naquele mesmo período, a sobrevivência do 'Saracura' foi de 75%. Desta forma, observa-se que em relação à variedade BR 107, a variedade Saracura BR 154 apresenta-se com alta tolerância à hipoxia.

A variedade Saracura BR-154 foi desenvolvida no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) como uma opção para o cultivo em áreas sujeitas ao encharcamento. Esse composto de milho de ampla base genética foi estudado em nove ciclos da seleção massal e obteve, sob condições de deficiência de oxigênio no meio, aumentos em alguns parâmetros relacionados com a produção, os quais permitiram a sua seleção (Parentonni et al. 1996).

Trabalhando com diversos híbridos sob condições de estresse anaeróbico, Lemke-Keyes & Sachs (1989) verificaram que a variedade B73Ht e apresentou melhor desempenho, chegando a índices de sobrevivência de 61% e 14%, após 3 e 4 dias de estresse anaeróbico, respectivamente. Para o mesmo período sob deficiência de oxigênio no meio, a variedade Saracura apresentou índices de sobrevivência de 85% e 73% e, mesmo após 5 dias de anoxia, ainda

manteve índice de sobrevivência de 29%, valor superior a mais que duas vezes o índice obtido pela variedade americana B73Ht (Figura 1).

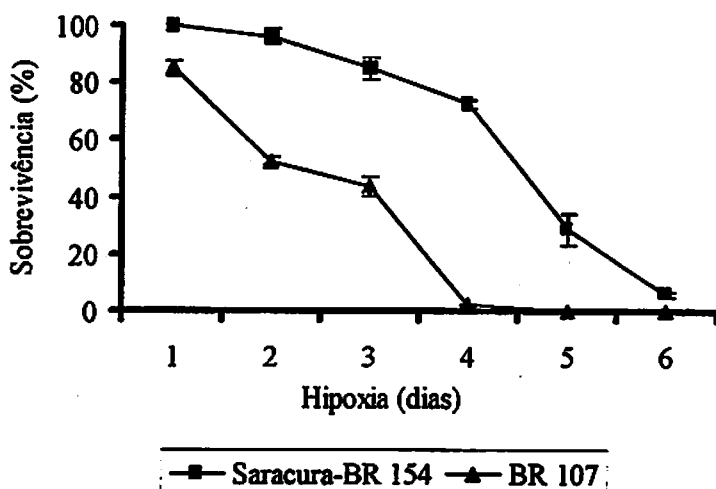


Figura 1. Sobrevivência de plantas de milho das variedades BR 107 e Saracura-BR154 submetidas a condições de deficiência de oxigênio. UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4)

Somente a partir do quarto dia de deficiência de oxigênio as plantas de Saracura mostraram queda acentuada na sobrevivência, tornando-se flácidas, com reflexos negativos na recuperação pós-hipoxia. Plantas que não conseguiram sobreviver pós-hipoxia apresentaram, na região do mesocótilo, durante o estresse, um aspecto translúcido, com aparente lise das células (Figura 2). Com o prolongamento do déficit de oxigênio, a plântula como um todo tomou-se flácida, formando-se, na região translúcida, uma forte constrição responsável pelo tombamento e morte das mesmas. Esses resultados sugerem que a formação da região translúcida é o primeiro sinal indicativo da irreversibilidade dos danos causados pelo déficit de oxigênio. A variedade BR 107, quando comparada com Saracura-BR 154, apresentou uma formação precoce deste fenômeno.



Figura 2. Segmentos do mesocótilo com aparência e consistência distintas (normal, translúcido e constrição) de plântulas de milho submetidos a condições de deficiência de oxigênio.

Saab & Sachs (1996), estudando o envolvimento de enzimas no metabolismo de parede celular e suas possíveis relações com o desenvolvimento de aerênquimas em plântulas de milho sob deficiência de oxigênio no meio, também observaram que plântulas tratadas anaerobicamente desenvolveram zonas amolecidas no mesocótilo, as quais eventualmente, evoluíram para toda a planta. De acordo com os mesmos autores, pode estar envolvida neste processo a ação do gene [*wus11005/(gfu)*] induzido pelo alagamento, o qual codifica, para uma proteína homóloga da xiloglucana *endotransglicosidase*, uma enzima responsável pelo afrouxamento da parede celular (Peschke & Sachs, 1994; Saab & Sachs, 1995). Como a expressão desse gene chega ao máximo após 12 horas de tratamento e a formação de aerênquimas no mesmo local ocorre após 48

horas de tratamento, sugere-se o envolvimento de outros genes que codificam enzimas degradativas da parede celular.

Um dos fatores limitantes à sobrevivência das plantas sob deficiência de oxigênio no meio é a acidificação do citoplasma. Para ambas as variedades em estudo, verificou-se um aumento da acidificação do tampão de alagamento com o tempo de hipoxia (Figura 3).

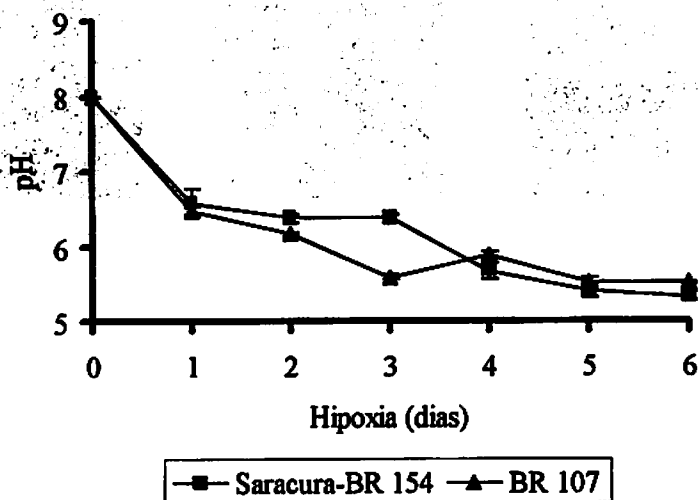


Figura 3. Valores de pH do tampão de alagamento em função do período de hipoxia. UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4)

Drew (1997) observou que em milho, sob condições de deficiência de oxigênio, ocorre um desvio da respiração aeróbica em favor de rotas fermentativas produzindo lactato e H^+ . Do lactato produzido, grande parte foi encontrada no meio de cultivo sugerindo um mecanismo muito eficiente de eliminação desse produto para o meio externo (Rivoal & Hanson, 1993). No presente caso, os decréscimos nos valores de pH com o aumento do tempo de


hipoxia podem estar relacionados a esse mecanismo de regulação que impede que o pH citoplasmático atinja um nível letal para a célula.

4.2 Cromatografia gélida

O perfil gel cromatográfico das frações substâncias pécicas, hemicelulose 2 e 4 M isoladas dos segmentos apical e basal do mesocótilo com aparência normal, zona translúcida e constrição, sugere que a evolução do estresse de oxigênio provocou degradação da parede celular. Percebe-se claramente na fração substâncias pécicas da seção apical do mesocótilo com zona translúcida e de constrição, o aparecimento de um expressivo pico por volta da fração 31 e a presença de açúcares de baixo peso molecular a partir da fração 61, o que não aconteceu com o tecido normal (Figura 4). O deslocamento do pico de absorvância para a direita revela o aparecimento de polímeros com peso molecular menor, presentes também em várias frações (setas) da região basal do mesocótilo afetado pela baixa disponibilidade de oxigênio no meio, como resultado da degradação da parede celular naquela região.

Com relação aos cromatogramas obtidos das frações de hemicelulose 2 M extraídas das zonas translúcida e de constrição da porção apical e basal (Figura 5), nota-se a existência de alguns polímeros de peso molecular intermediário próximos das frações de número 25 e 35 e a presença de polímeros de baixo peso molecular ao redor da fração de número 55, comprovando a degradação da parede celular, ausente no tecido normal. Resultados semelhantes foram verificados nos cromatogramas de frações hemicelulose 4M, tanto na porção apical como basal (Figura 6).

De maneira geral, as amostras de mesocótilo com aparência translúcida e de constrição das frações substâncias pécicas, hemicelulose 2 e 4M



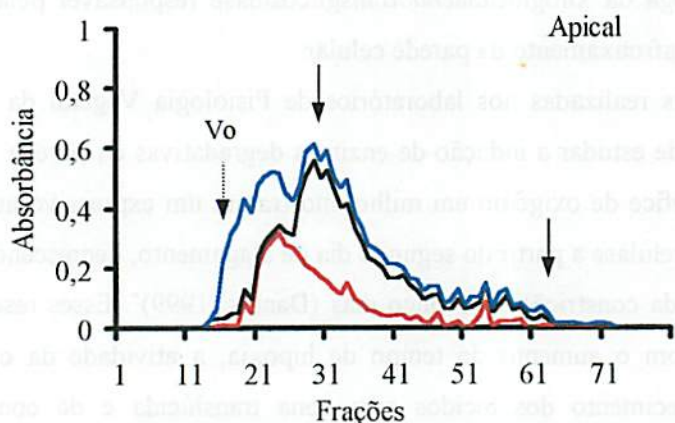
apresentaram maior absorvência que aquelas oriundas do tecido normal. Tal fato sugere que a degradação da parede celular nos tecidos afetados pela deficiência de oxigênio, expôs extremidades dos polímeros ao ataque do agente cromógeno, de acordo com a intensidade do dano (normal < translúcido < constrição). Essa sequência de intensidade de danos provavelmente foi decorrente da ação coordenada de enzimas hidrolíticas de parede celular (Peschke & Sachs, 1994; Saab & Sachs, 1996) tais como celulases, pectinametilesterases, poligalacturonases e xiloglucana*endo*transglicosidase (Fischer & Bennett, 1991; Fry, 1995) que atuam despolimerizando seus componentes, originando materiais de pesos moleculares menores.

Diversos relatos encontrados na literatura relacionam o aparecimento de polímeros de peso molecular menor na cromatografia gélica originados da ação degradativa das enzimas hidrolíticas sobre os componentes da parede celular. Foram observados em frutos de tomate (Carrington, Greve & Labavitch, 1993) e manga (Faria et al., 1994 e Sobac et al., 1997) incrementos drásticos na atividade da poligalacturonase no início do processo de amadurecimento exercendo um efeito direto no amolecimento dos tecidos. Panavas, Reid & Rubinstein (1998) relataram que, à medida em que ocorre a senescência de tecidos de pétalas de lírio, as atividades das enzimas celulase e poligalacturonase aumentam, o que também ocorre previamente com a pectinametilesterase. Esse fato confirma o observado por Gaffe, Tiznado & Handa (1997) de que pectinametilesterase desesterifica as pectinas, tornando-as mais acessíveis à degradação pela poligalacturonase uma vez que esta é mais ativa na degradação de pectinas desmetiladas que metiladas (Seymour et al., 1987; Koch & Nevins, 1989). Fannut, Gidley & Reid (1993) também apresentam resultados que levam a concluir sobre a participação da xiloglucana*endo*transglicosidase na degradação da parede celular. Saab & Sachs (1996) sugerem a existência de uma

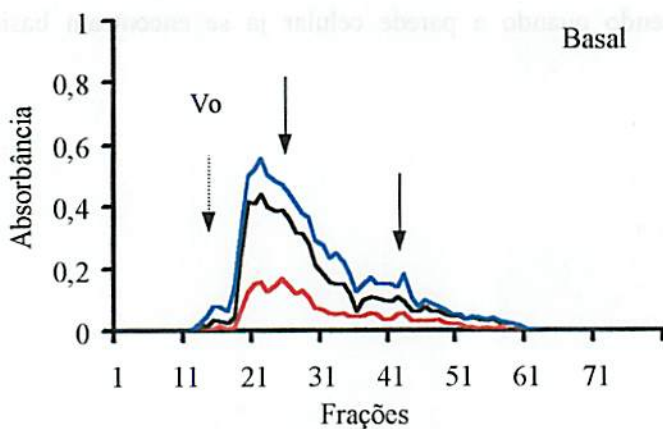
proteína homóloga da xiloglucana *endo*transglicosidase responsável pela perda da integridade e afrouxamento da parede celular.

Pesquisas realizadas nos laboratórios de Fisiologia Vegetal da UFLA com o objetivo de estudar a indução de enzimas degradativas da parede celular associadas ao déficit de oxigênio em milho, mostraram um expressivo aumento da atividade da celulase a partir do segundo dia de alagamento, decrescendo com o aparecimento da constrição, aos cinco dias (Dantas, 1999)*. Esses resultados sugerem que, com o aumento do tempo de hipoxia, a atividade da celulase provoca o aparecimento dos tecidos com zona translúcida e de constrição (Figura 2), ao exercer sua função degradativa na parede celular. De maneira semelhante, He, Drew & Morgan (1994) também mostraram que a atividade da celulase em plantas de milho sob hipoxia apresenta um aumento gradativo com o estresse decrescendo quando a parede celular já se encontram basicamente desestruturada.

* Dantas, B.F. (Comunicação pessoal, aluna do curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal



— N — T — C



— N — T — C

Figura 4. Perfil gélico da fração substâncias pécticas das porções apical e basal de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e constrição - C) submetidos à deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

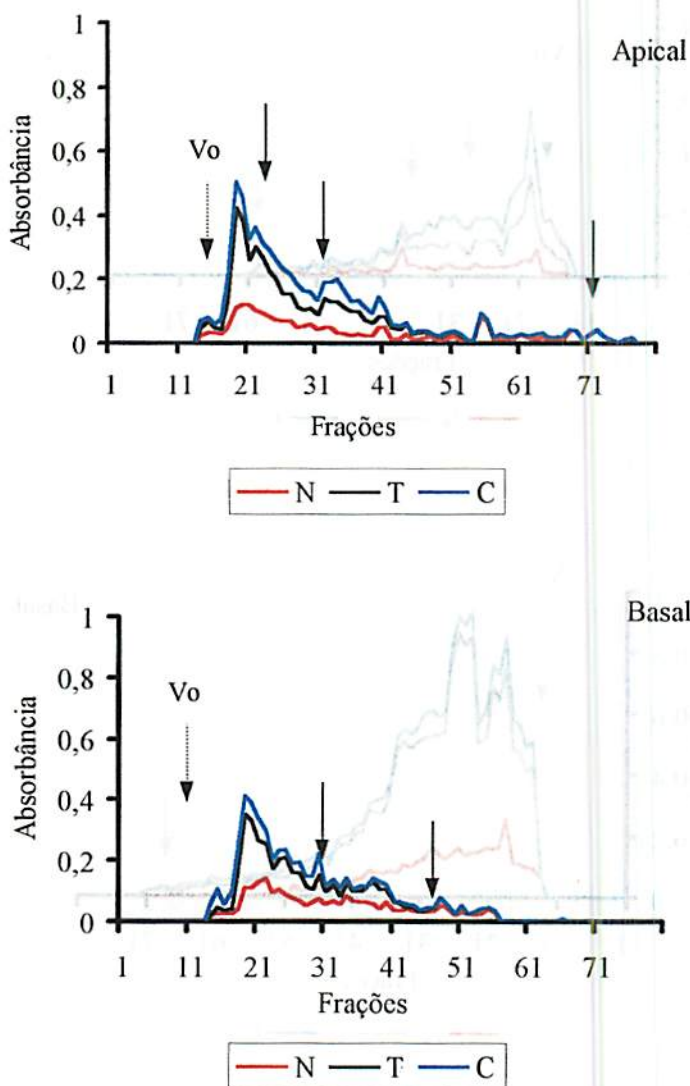


Figura 5. Perfil glicó da fração hemicelulose 2 M das porções apical e basal de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e construção - C) submetidos à deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

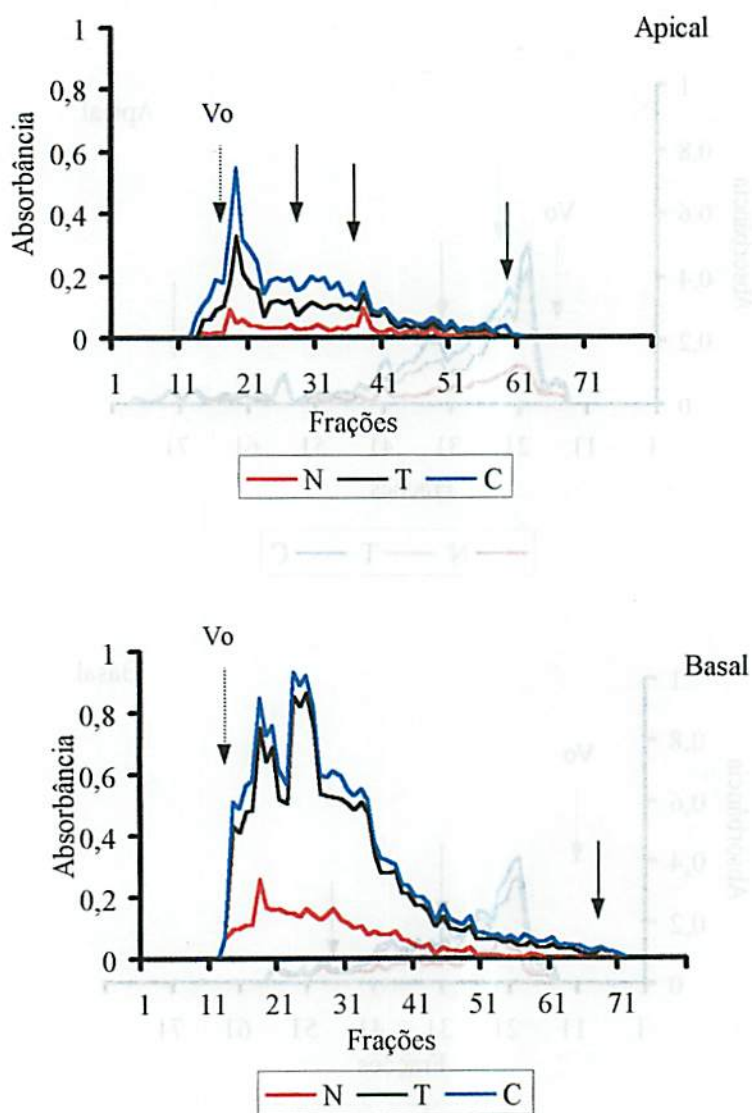


Figura 6. Perfil gélido da fração hemicelulose 4 M das porções apical e basal de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e constrição - C) submetidos à deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

4.3 Cromatografia gasosa

A composição dos açúcares neutros na fração pécica apresentou uma predominância de xilose, arabinose e manose (Figura 7). Na porção apical do mesocótilo, a concentração desses açúcares decresceu com o aparecimento e intensidade do estresse (Figura 7 A). Após os estágios iniciais de degradação da parede celular provocada pela deficiência de oxigênio, esses açúcares sofreram uma translocação para a parte basal do mesocótilo, fato confirmado pelos elevados teores dos açúcares no tecido com aparência translúcida naquela região (Figura 7 B).

Com relação à fração hemicelulose 2M, novamente observa-se a predominância de arabinose, xilose e manose nos três tipos de tecidos, além do aparecimento de glicose e fucose (Figura 8). A presença desses açúcares de peso molecular mais baixo também foi comprovada na cromatografia gélida para a fração hemicelulose 2M apical (Figura 5), quando visualiza-se os picos por volta das frações de número 70. Com relação à fração hemicelulose 4M, observou-se principalmente a presença de xilose, rhamnose, fucose, arabinose e manose (Figura 9).

Com o estresse visualiza-se, na porção basal (Figura 9), uma diminuição da xilose com um aumento nas concentrações de rhamnose e fucose. Segundo Gross (1984), a presença da rhamnose, que é um componente pécico, na fração hemicelulose 4M porção basal justifica-se pelo fato de existirem pectinas covalentemente ligadas, o que dificulta a sua remoção, mesmo com uma solução alcalina forte como o KOH 2M. Basicamente, a composição de parede celular de gramíneas possui uma pequena porção de pectinas (Kim e Carpita, 1992). Em variedades de milho estudadas, a proporção entre arabinose e xilose encontrada foi de 1:1 (Kato e Nevins, 1984). No presente trabalho, todas as frações analisadas apresentaram uma maior proporção de xilose em relação à arabinose.

Sachs e Saab (1996), já citados anteriormente, sugeriram que a hipoxia provoca um certo amolecimento na região do mesocótilo de plântulas de milho devido a uma degeneração da parede celular. Os dados apresentados permitem inferir que a deficiência de oxigênio no meio provocou a ação de enzimas hidrolíticas que por sua vez, agiram na integridade da parede celular, ocasionando a sua degeneração, que foi confirmada pelas cromatografias gélica e gasosa.

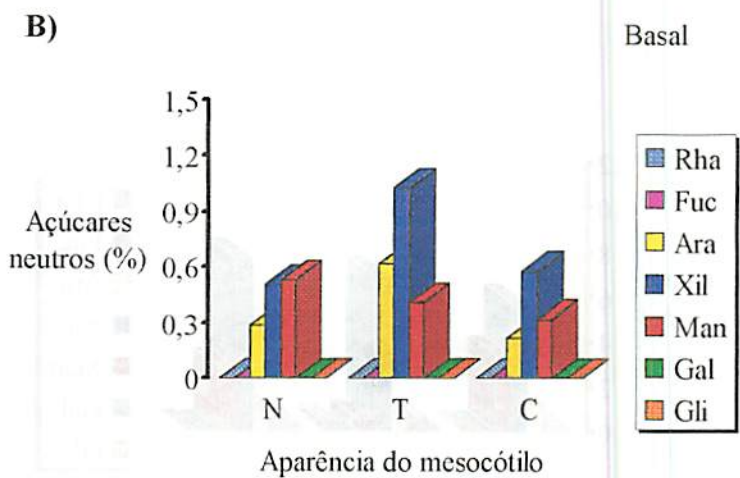
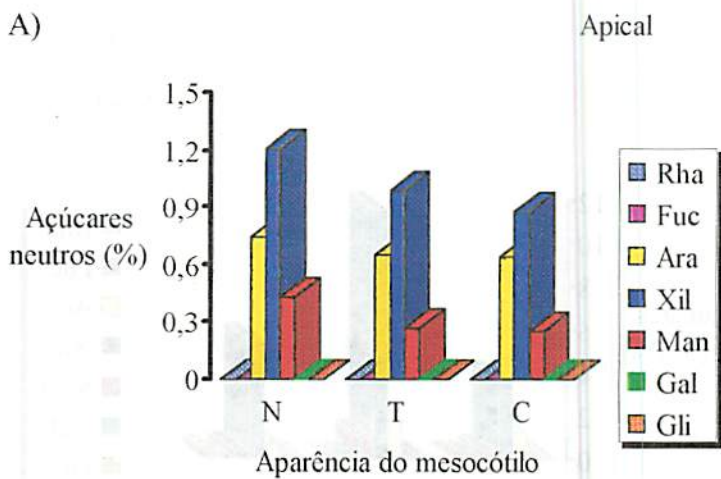


Figura 7. Composição dos açúcares neutros da fração substâncias pécicas de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e constrição - C) submetidos deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

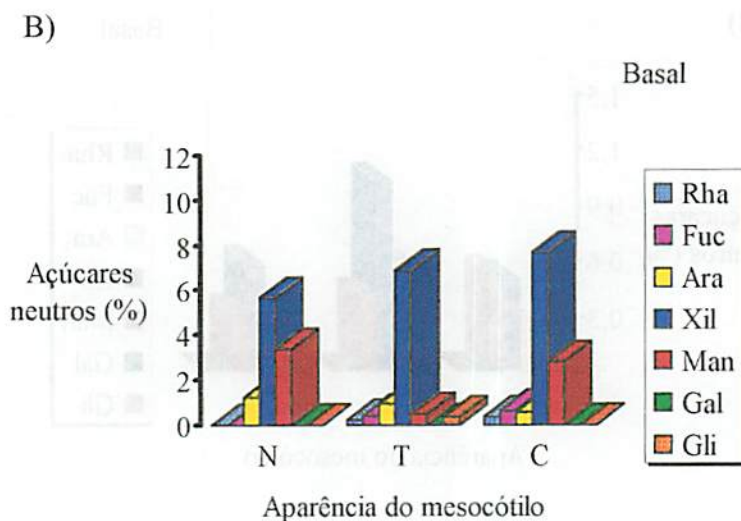
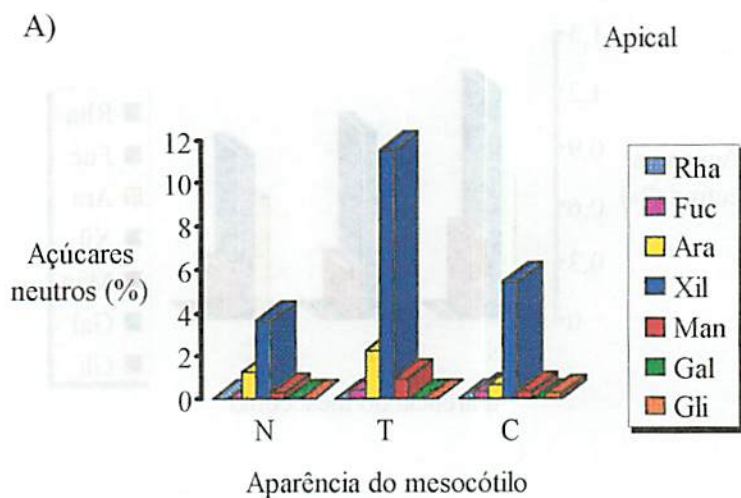


Figura 8. Composição dos açúcares neutros da fração hemicelulose 2M de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e constrição - C) submetidos a deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

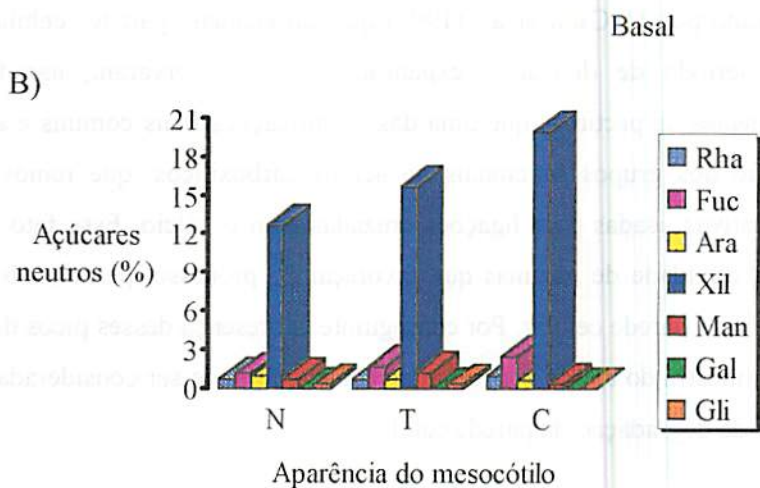
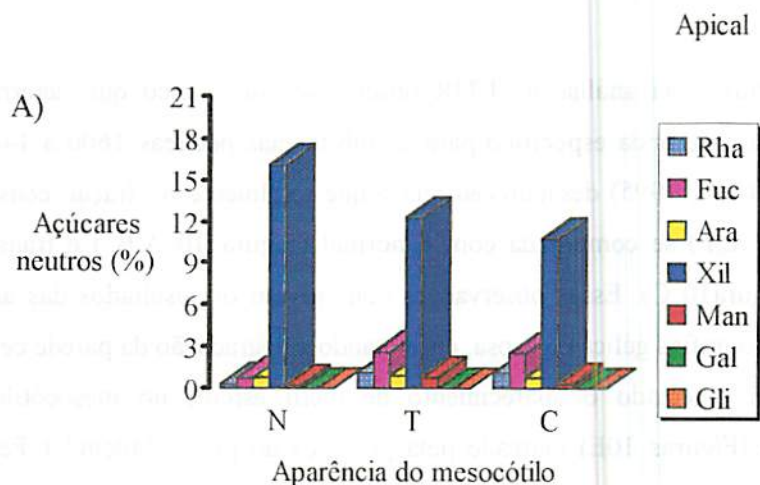


Figura 9. Composição dos açúcares neutros da fração hemicelulose 4M de segmentos de mesocótilo de milho (normal - N, translúcido - T e constrição - C) submetidos a deficiência de oxigênio no meio. UFLA, Lavras-MG, 1999.

4.4 Espectro de infravermelho com transformação dos dados pela série de Fourier.

Através da análise de FTIR observa-se que o pico que determina o comprimento de onda específico para as substâncias pécticas 1600 a 1440cm⁻¹ (Perlin & Casu, 1995) desapareceu quase que totalmente na fração constrição, (Figura 10 E,F) se comparada com o normal (Figura 10 A,B) e translúcido apical (Figura10 C). Essas observações comprovam os resultados das análises das cromatografias gélica e gasosa, constatando a degradação da parede celular.

Foi detectado o aparecimento de metil ésteres no mesocótilo com constrição (Figuras 10E) marcado pela presença do pico 1740cm⁻¹ (Perlin & Casu, 1995), o que não ocorreu quando foram analisados os tecidos de mesocótilo normal (Figura 10A) e translúcido (Figuras 10C). Este fato também foi constatado por McCann et al. (1997) que, ao estudar paredes celulares de fumo no período de divisão e expansão celular, observaram, nas frações correspondentes às pectinas, que uma das modificações mais comuns é a metil esterificação dos grupos funcionais de ácidos carboxilícos, que removem as cargas negativas usadas para ligações cruzadas com o cálcio. Esse fato sugere uma maior atividade de enzimas que favoreçam o processo, permitindo maior flexibilidade da parede celular. Por conseguinte, a presença desses picos de metil ésteres na amostra do tecido com zona de constrição pode ser considerada como um indício da degradação da parede celular.

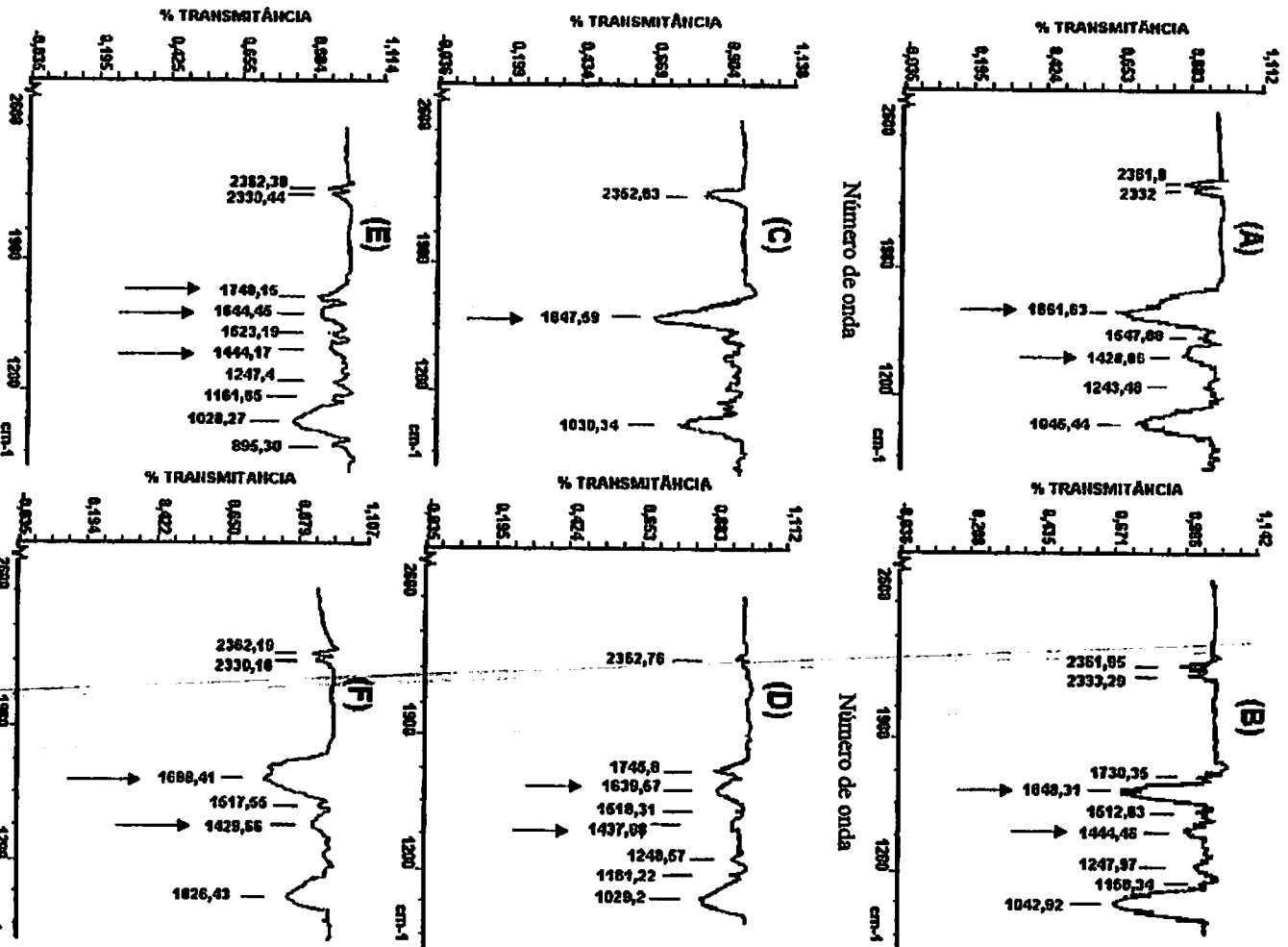


Figura 10. Espectro de FTIR em porosés distintas de mesocélulo de milho Saracura-BR 154 submetido à hipoxia: (A)normal apical, (B) normal basal, (C) transudado apical, (D) transudado basal, (E) construção apical, (F) construção basal. IBv/USP, São Paulo-SP, 1999.

4.5 Efeito do cálcio na sobrevivência de plântulas de milho submetidas à deficiência de oxigênio no meio.

Inicialmente foi feito um experimento a fim de avaliar a influência de diferentes formas de aplicação e doses de CaCl_2 na tolerância do Saracura à hipoxia. A produção de matéria seca das plantas, aumentou com o incremento das doses de CaCl_2 até a concentração de 0,51% (Figura 11) e a partir daí houve uma tendência de sua estabilização até a dose de 1%. Esse fato reforça experiências de diversos autores citados por Marschner (1997) os quais relatam a importância desse elemento na nutrição e desenvolvimento de plantas.

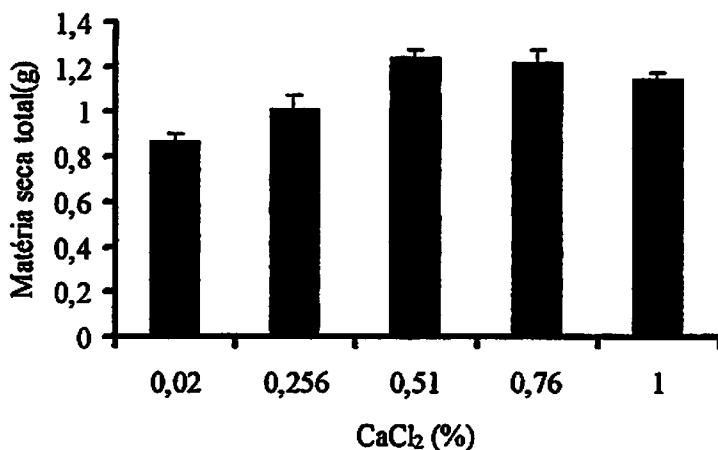


Figura 11. Valores médios de produção de matéria seca de plantas de milho Saracura-BR 154 sob deficiência de oxigênio, em função de diferentes doses de CaCl_2 . UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média $n = 4$)

A forma mais eficiente de aplicação do cálcio foi detectada quando este foi adicionado conjuntamente no papel de germinação e no tampão de alagamento (Figura 12). A superioridade desse tratamento revela que o cálcio é importante desde o período de germinação pela sua presença no papel de germinação, até o período de anoxia, quando o tampão de alagamento também apresenta uma concentração de cálcio equilibrada. Por outro lado, a aplicação do cálcio somente no papel de germinação revelou-se pouco eficiente pela sua provável diluição, durante a permanência no tampão de alagamento. Tem sido relatado na literatura, o importante papel do cálcio na germinação. Castillo, Smith & Yadava (1998) estudando a influência do CaCl_2 na germinação de sementes de mamão, verificaram significativo aumento na germinação quando em exposição ao CaCl_2 . O cálcio também está envolvido na divisão celular (Marschner, 1997 e Zhang, Liu Dan & Cass, 1997) e o seu fornecimento externo se reflete em aumento no crescimento e desenvolvimento das plântulas.

As plântulas, na ausência do cálcio ou em doses abaixo de 0,51% apresentaram, precocemente, um aspecto flácido que em estádios mais avançados ocasionou o tombamento das mesmas devido ao aparecimento de uma constrição na região do mesocótilo, conforme demonstrado na Figura 2.

O cálcio prolongou a sobrevivência de ambas as variedades de milho durante o período de alagamento (Figura 13) sendo que, no caso do Saracura, contribuiu para a plena sobrevivência das plantas até o quarto dia (Figura 13A). A partir daí, a sobrevivência caiu lentamente até o sexto dia, atingindo o nível de 65%. Na ausência desse elemento a sobrevivência caiu lentamente até o quarto dia de alagamento, quando, então, caiu abruptamente, atingindo ao final do experimento, a pequena taxa de 6%.

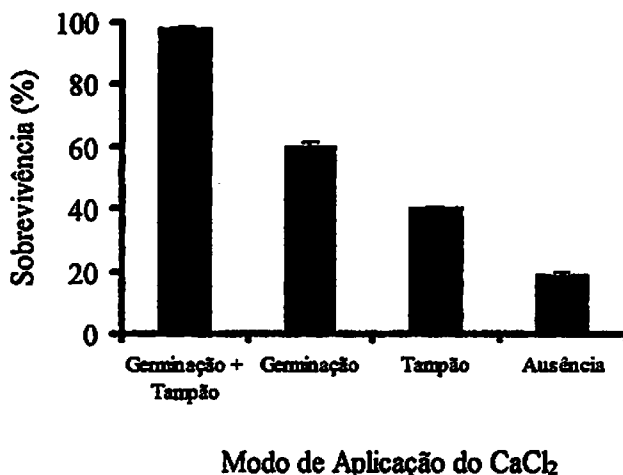


Figura 12. Sobrevivência de plantas de milho variedade Saracura-BR 154 sob condição de baixa disponibilidade de oxigênio, em função do modo de aplicação da solução de CaCl₂ UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4).

A sobrevivência das plantas de BR 107 na presença de cálcio caiu lentamente durante todo o período experimental, chegando a 32% (Figura 13B). Por outro lado, na ausência do elemento, já no primeiro dia de hipoxia observou-se uma queda na sobrevivência das plantas e, no quarto dia, todas as plantas de BR 107 estavam mortas, ao passo que neste mesmo período, a sobrevivência desta variedade na presença do cálcio foi de 65%.

O Saracura-BR 154 comportou-se, comparativamente ao BR 107, como uma variedade altamente tolerante a hipoxia. Na ausência do cálcio, o Saracura suportou até 2 dias de anoxia sem prejuízo na taxa de sobrevivência; na presença do elemento essa sobrevivência foi prolongada para quatro dias. Por outro lado, para o BR 107, o cálcio foi capaz de elevar a sobrevivência desta variedade tida

como sensível acima daquela observada para o Saracura, quando este foi submetido à hipoxia, na ausência do cálcio, por mais de quatro dias.

Diversos trabalhos têm sido realizados com a finalidade de estender o período máximo de alagamento ou de exposição de uma cultura ao estresse anóxico ou hipóxico. Pré-tratamento de hipoxia antes do período de anoxia (Drew 1997; Johnson, Cobb & Drew, 1994), aplicações exógenas de hormônios (Ellis et al. 1999) e açúcares (Perata, Guglielminetti & Alpi, 1997) são os tratamentos mais comumente encontrados na literatura. Os resultados mostraram que, para o milho, a aplicação de cálcio prolonga o período de máxima exposição das plantas à deficiência de oxigênio no meio, atrasando a formação das regiões translúcidas e de constrição no mesocótilo com posterior morte das plantas.

A maior firmeza dos tecidos vegetais, ocorre devido à associação do cálcio na parede celular através de ligações com o ácido poligalacturônico formando os pectatos de cálcio que atuam como agente cimentante entre as células (Conway, Sams & Watada, 1995, Shear, 1975; Salunke, Bolin & Reddy, 1991). Estudos feitos por Kobayashi et al. (1999) comprovam a importância do cálcio mediando as ligações de ésteres entre rhamnogalacturonanas, fazendo com que as ligações das pectinas de paredes celulares tornem-se mais estáveis. Existem evidências de que o cálcio possa atuar na inibição e/ou síntese das enzimas poligalacturonase (Heppler e Wayne, 1985; Burns e Pressey, 1987), pectinametilsterase (Subramanyam et al., 1976; Steele et al., 1997), celulase (He, Drew & Morgan, 1994 e He et al., 1996) e xiloglucanendo-transglycosylase (Peschke & Sachs, 1994; Saab & Sachs, 1995).

Para o Saracura-BR 154 Dantas (1999)* verificou que o cálcio retarda a atividade da celulase em plântulas de milho sob hipoxia, fazendo com que o

* Dantas, B.F. (Comunicação pessoal, aluna do curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal do DBI/UFLA).

aparecimento dos sintomas, como a zona translúcida e de constrição (Figura 2), relacionado com o afrouxamento e degradação da parede celular, respectivamente, apareça mais tardiamente na sua presença.

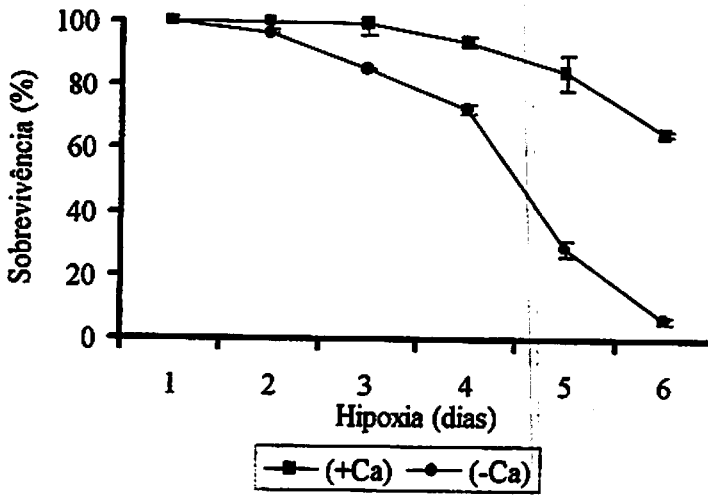


Figura 13A. Sobrevivência de plantas de milho variedade Saracura-BR 154, na presença e ausência de cálcio, em função do tempo de deficiência de oxigênio. UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4).

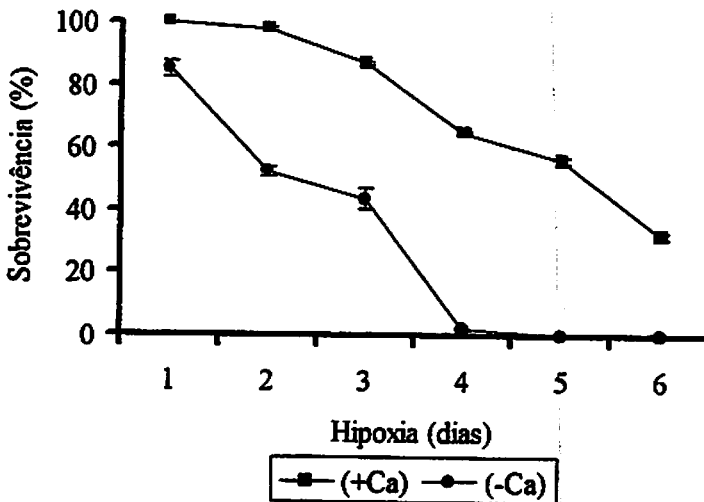


Figura 13B. Sobrevivência de plantas de milho variedade BR 107, na presença e ausência de cálcio, em função do tempo de deficiência de oxigênio. UFLA, Lavras-MG, 1999 (barras indicam média + ou - erro padrão da média n = 4).

5 CONCLUSÕES

Comparativamente a BR 107, a cv. Saracura–BR 154 apresentou-se altamente tolerante à hipoxia, comprovando o desempenho no campo durante o processo de seu melhoramento genético. A hipoxia, em períodos prolongados, causou desestruturação a parede celular, formando, na região do mesocótilo, uma intensa lise de células que, em estádios mais avançados, levou à formação de uma constrição no local, levando ao tombamento e morte das plantas. As modificações na parede celular foram confirmadas pelas cromatografias gélica e gasosa e pela análise de FTIR. O fornecimento exógeno de cálcio prolongou a sobrevivência de ambas as variedades durante o período de alagamento, retardando as modificações na parede celular e, por conseguinte, os danos descritos anteriormente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.5, p.340-345, 1967.
- ARMSTRONG, W.; BRANDLE, R.; JACKSON, M.B. Mechanism of flooding tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v.43, n.4, p.307-358, Dec. 1994.
- 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.
- BITTER, T.; MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 34, p.330-334, 1962.
- BRETT, C.; WALDRON, K. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. London, Hyman, 1990. 194p.
- BURNS, J.K.; PRESSEY, R. Ca^{2+} in cell walls of ripening tomato and peach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.112, n.5, p.783-787, Sept.1987.
- CARPITA, N.C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Palo Alto, v.47, p.445-476, 1996.
- CARPITA, N.C. The biology and biochemistry of the plant cell wall. São Paulo.IBt/USP. 1998. (snp). (Notas de aula).
- CARRINGTON, C.M.S.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism in ripening fruit. VI. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiology*, Rockville, v.103, n.2, p.429-434, Oct. 1993.
- CASTILO, B.; SMITH, M.A.L. ; YADAWA, U.L. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Reports*, Secaucus, v.17, n.3, p.172-176, Jan. 1998.

- CONWAY, W.S., SAMS, C.E.; WATADA, A.E. Relationship between total and cell wall bound calcium in apples following postharvest pressure infiltration of calcium chloride. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 398. p.31-39, 1995.
- CRAWFORD, R.M.M.; JAMES, E.K. Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v.49, n.320, p.599-609, Mar. 1998.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimatation 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., GIFFARD, S. Etylen-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L., New York, *Planta*, v.147, n.1, p.83-88, Oct. 1979.
- ELLIS, M.H.; DENNIS, E.S.; PEACOCK, W.J. Arabidopsis roots and shoots have different mechanisms for hypoxic stress tolerance. *Plant Physiology*, Washington, v.119, n.1, p. 57-64, Jan. 1999.
- FANUTTI, C.; GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. Action of a pure xyloglucan endo-transglycosylase (formerly called xyloglucan-specific endo-(1→4)-β-D-glucanase) from the cotyledons of germinated nasturtium seeds. *Plant Journal*, Oxford, v.3, p.691-700. 1993.
- FARIA, A.J.B.; CAVALCA, M.M.; FERREIRA, R.C.; JANZANTI, N.S. Transformações enzimicas das substâncias pécicas da manga (*Mangifera indica* L.) v. Haden no amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.14, n.2, p.189-201, Jul/Dez. 1994.
- FELLE, H.H.; HEPLER, P.K. The cytosolic Ca²⁺ concentration gradient of *Sinapis alba* root hairs as revealed by Ca²⁺-selective microelectrode tests and fura-dextran ratio imaging. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, n.1, p.39-45, May, 1997.
- FISHER, R.L.; BENNETT, A.B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Palo Alto, v.42, p.675-703, 1991.
- FOX, T. C.; KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E. Energetics of plant growth under anoxia: metabolic adaptation of *Oryza sativa* and *Echinochoa phyllopogon*. *Annals Botany Company*, v.174, p.445-455, 1994.

- FRY, S.C. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v.46, p.497-520, 1995.
- GAFFE, J.; TIZNADO, M.E.; HANDA, A.K. Characterization and functional expression of a ubiquitous expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, n.4, p.1547-1556, Aug. 1997.
- GERMAIN, V.; RICARD, R.; RAYMOND, P.; SAGLIO, P.H. The role of sugars, hexokinase, and sucrose synthase in the determination of hypoxically induced tolerance to anoxia in tomato roots. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, n.1, p.167-175, May 1997.
- GROSS, K.C. Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v.62, n.1, p.25-32, Sept. 1984.
- HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. during hypoxia or nitrogen starvation. *Plant Physiology*, Rockville, v.105, n.3, p.861-865, July 1994.
- 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*, Rockville, v.112, n.4, p.1679-1685, Dec.1996.
- HE, C.J.; MORGAN, P.W.; DREW, M.C. Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen- or phosphate-starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation. *Plant Physiology*, Rockville, v. 98, n.1, p.137-142, Jan.1992.
- HEPPLER, P.K.; WAYNE, R.O. Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Palo Alto, v.36, p.397-439, 1985.
- HOLE,D.J.; COBB, B.G.; HOLE, P.S.; DREW, M.C. Enhancement of anaerobic respiration in root tips of *Zea mays* following low-oxygen (hypoxic) acclimation. *Plant Physiology*, Rockville, v.99, n.1, p.213-218, May 1992.
- HUYSAMER, M.; GREVE, L.C.; LABAVITCH, J.M. Cell wall metabolism in ripening fruit. VIII. Cell wall composition and synthetic capacity of two regions of outer pericarp of mature green and red ripe cv. Jackpot tomatoes. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.101, n.2, p.314-322, Oct. 1997.

- A
- INOUE, M. ; NEVINS, D.J. Changes in the autolytic activities of maize coleoptile cell walls during coleoptile growth. **Plant Physiology**, Rockville, v.38, n.2, p.161-167, Jan.1997.
- JOHNSON, J.R.; COBB, B.G. ; DREW, M.C. Hypoxic induction of anoxia tolerance in roots of *Adh1* null *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v.105, n.1, p.61-67, May 1994.
- KATO, Y.; NEVINS, D.J. Enzymic dissociation of *Zea* shoot cell wall polysaccharides. IV. Dissociation of glucuronoarabinoxylan by purified endo-(1-4) β -D-xylanase from *Bacillus subtilis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, n.3, p.759-765, July 1984.
- KELLEY, P.M. ; FREELING, M. Anaerobic expression of maize fructose-1,6-diphosphate aldolase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.259, n.22, 14180-14183p, 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.4, p.1076-1080, Dec.1986.
- KENDE, W.; KNAAP, E. Van der. ; CHO, H. Deepwater Rice: A model plant to study stem elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p.1105-1110. 1998.
- KIN, J.B. ; CARPITA, N.C. Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, n.2, p.646-653, Feb.1992.
- KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; ASAKA, T. ; MATOH, T. Borate-Rhamnogalacturonan II bonding reinforced by Ca^{2+} retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, n.1, p.199-203, Jan. 1999.
- KOCH, J.L. ; NEVINS, D.J. Tomato fruit cell wall. I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify development changes in pectins. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, n.3, p.816-822, Nov. 1989.
- KOZLOWSKI, T.T. Responses of woody plants to flooding and salinity.[on line].Disponível:<http://www.heronpublishing.com/tp/monograph/kozlowski.pdf> . [capturado em 7 de fevereiro de 1999].(Tree Physiology Monograph,1.)

- LASZLO, 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. 151p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- LOPES, M.A, PARENTONI, S.N., MAGNAVACA, R. Adaptaciones morfológicas y fisiológicas en plantas de maiz sometidas a deficiência de oxigeno en el suelo. IN: IICA-BID-PROCIANDINO. II Seminario de Mejoramiento para Tolerancia a Factores Ambientales Adversos en el Cultivo del Maiz. Ed. por B. RAMAKRISNA. Quito, Ec. PROCIANDINO, p. 106-124. 1988.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition. Academic Press. Harcourt Brace ; Company, Publishers. London. 1997. 889p.
- McCANN, M.C.; CHEN, L.; ROBERTS, K.; KEMSLEY, E.K.; SENE, C.; CARPITA, N.C.; STACEY, N.J. ; WILSON, R.H. Infrared microspectroscopy; Sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.100, n.3, p.729-738, July 1997.
- MENEZES NETO, M.A.; ALVES, J.D.; OLIVEIRA, L.E.M. Anaerobic metabolism in *Euterpe oleracea*. I. Alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and seed embryo development. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.7, n.1, p.41-45, Abril 1995.
- MILHO. Indicadores da Agropecuária, Brasília, v.8, n.2, p.37, fev. 1999
- MITCHAN, E.J.; McDONALD, R.E. Cell wall modification during ripening of "Keit" and "Tommy Atkins" mango fruit. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.117, n.6, p.919-924, Nov.1992.
- OSUNDINA, M.A. Nodulation and growth of mycorrhizal *Casuarina equisetifolia* J.R. and G. First in response to flooding. **Biology and Fertility of Soils**. v.26, n.2, p.95-99, Jan. 1998.

- PANAVAS T.; REID, P.D. ; RUBINSTEIN, B. Programmed cell death of daylily petals: Activities of wall-based enzymes and effects of heat shock. *Plant Physiological Biochemistry*, v.36, n.5, p.379-388, 1998.
- PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.G.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; 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. 1996
- PERATA, P.; GUGLIELMINETTI, L. ; ALPI, A. Mobilization of endosperm reserves in cereal seeds under anoxia. *Annals of Botany*. v.79. (Supplement A): p.49-56. Jan. 1997.
- PERLIN, A.S. ; CASU, B. Spectroscopic methods. In. ASPINALL, G.O. The polysaccharides. v.1. Academic Press. 1995. 177-185p.
- PESCHKE, V.M. ; SACHS, M.M. Characterization and expression of anaerobically induced maize transcripts. *Plant Physiology*, Rockville, v.104, n.2, p 387-394, Feb. 1994.
- PEZESHKI, S. R.; PARDUE, J. H.; DeLAUNE, R. D. Leaf gas exchange and growth of flood-tolerant and flood-sensitive tree species under low soil redox conditions. *Tree Physiology*, Victoria, v.16, n.4, p.453-458, April, 1996.
- PEZESHKI, S.R. Plant Response to Flooding, p.321; In: WILKINSON, R. E. *Plant environment interactions*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1994. 599p.
- RIVOAL, J. ; HANSON, A.D. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *limonium*. *Plant Physiology*, Rockville, v.101, n.2, p.553-560, Feb. 1993.
- RIZZINI, C.T. *Tratado de Fitogeografia do Brasil*. São Paulo. HUCITEC Ed da Universidade de São Paulo. Brazil. 1976.
- RUSSEL, D.A. ; SACHS, M.M. The maize glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis. *Molecular and General Genetics*, 229, 219-228p. 1991.
- RUSSEL, D.A., SACHS, M.M. Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress. *Plant Physiology*, Rockville, v. 99, n.2, p.615-620, June. 1992.

- 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.
- SAAB, I.N. ; SACHS, M.M. Complete cDNA and genomic sequence encoding a flooding-responsive gene from maize (*Zea mays* L.) homologous to xyloglucan*endo*transglycosidase. *Plant Physiology*, Rockville, v.108, n.1, p.439-440, May, 1995.
- SAAB, I.N.; DAVID HO, T.H.; SHARP, R. Translatable RNA populations associated with maintenance of primary root elongation and inhibition of mesocotyl elongation by abscisic acid in maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiology*, Rockville, v.109, n.2, p.593-601, Oct. 1995.
- SACHS, M.M.; FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. *Molecular and General Genetics*, New York, v.161, 111-115p, 1978.
- SACHS, M.M., FREELING, M.; OKIMOTO, R. The anaerobic protein of maize. *Cell*, Cambridge, v.20, p.761-767, July, 1980.
- SACHS, M.M.; SUBBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *Journal Experimental Botany*, Firenze, v.47, n.294, p.1-15, Jan. 1996.
- 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 p.893-897. 1998.
- SALUNKE, D.K.; BOLIN, H. R.; REDDY, N. R. Storage, processing, and nutritional quality of fruits and vegetables; fresh fruits and vegetables. 2ed. Boston: CRC Press, 1991, 323p.
- SEIMOUR, G.B.; HARDING, S.E.; TAYLOR, A.J.; HOBSON, G.E.; TUCKER, G.A. Polyuronide solubilisation during ripening of normal and mutante tomato fruit. *Phytochemistry*, Oxford, v.26, n.12, p.3137-3139. Dec. 1987.
- SHEAR, C.B. Calcium related disorders of fruits and vegetables. *Hort Science*, Alexandria, v.10, n.4, p.361-365. Aug. 1975.
- SHEEN, J. Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *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.
- SIEBEL, H.N.; VanWIJK, M.; BLOM, C.W. Can tree seedlings survive increased flood levels of rivers? *Acta Botanica Neerlandica*, Oxford, v.47, n.2, p.219-230, Jun. 1998.
- SILVA, A.R.. Tolerância ao encharcamento. I Simpósio sobre Alternativas ao Sistema Tradicional de Utilização das Várzeas do Estado do Rio Grande do Sul. 1984. 22p.
- SOBAC, R.D.; CRUZ, J. de la; LUNA, A.V.; BERISTAIN, C.I.; GARCIA, H.S. Evaluation of softening and associated enzyme activities during the ripening of coated "Manila" mangoes. *Journal of Horticultural Science*, Kent, v.72, n.5, p.749-753, Sept.1997.
- SOUZA, A.L.B. Resistencia pós-colheita do pêsego (*Prunus persica* (L) Batsch cv. Biuti) a *Monilinia fructicola*: indução de respostas bioquímicas pela aplicação do CaCl₂ no local da injúria. Lavras; UFLA, 1998.161p. (Tese - Doutorado em Ciências dos Alimentos).
- SPRINGER, B.; WERR, W.; STARLINGER, P.; BENNETT, D.C.; ZOKOLICA, M.; FREELING, M. The *shrunk* 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.
- STEELE, N.A.; McCANN, M.C.; ROBERTS, K. Pectin modification in cell walls of ripening tomatoes occurs in distinct domains. *Plant Physiology*, Rockville, v.114, n.1, p.373-381, May, 1997.
- SUBBAIAH, C.C.; BUSH, D.S.; SACHS, M.M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cell. *The Plant Cell*, Rockville, v.6, n.12, p.1747-1762, Dec.1994.
- 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.
- SUBRAMANYAM, H.; GOURI, S.; KRISHNA MURTHY, S. Ripening behavior of mango fruits graded on specific gravity basis. *Journal of Food Science and Technology*, Mysore, v.13,n.1, p.84-86, Mar.1976.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City. 1991. 565p.

- TANG, Z.C.; KOZLOWSKI, T.T. Water relations, ethylene production, and morphological adaptation of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to floodings. *Plant and Soil*, Netherlands, v. 77, n. 2-3, p.183-192, Feb. 1984.
- VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. Plant adaptations to anaerobic stress. *Annals of Botany*, v.79,(Suplement A): p 3-20. 1997.
- ZHANG, G.C.; LIU, D.; CASS, D.D. Calcium induced sperm fusion in *Zea mays* L. *Sexual Plant Reproduction*. Alberta, v.10. n.2. p.74-82. 1997.