

CÁLCIO E O DESENVOLVIMENTO DE AERÊNQUIMAS E ATIVIDADE DE CELULASE EM PLÂNTULAS DE MILHO SUBMETIDAS A HIPOXIA

Bárbara França Dantas^{1,3*}; Carlos Alberto Aragão^{1,3}; José Donizeti Alves²

¹ Pós-Graduandos do Depto. de Produção Vegetal, Setor de Agricultura e Melhoramento Vegetal - FCA/UNESP, C.P. 237 - CEP: 18603-970 - Botucatu, SP.

² Depto. de Fisiologia Vegetal - UFLA, C.P. 37 - CEP: 37200-000 - Lavras, MG.

³ Bolsista CAPES.

*Autor correspondente <babita@fca.unesp.br>

RESUMO: A formação de aerênquimas é conhecida como uma das mais importantes adaptações anatômicas pelas quais as plantas passam quando são submetidas à deficiência de oxigênio. Esse tecido se desenvolve pela ação de enzimas de degradação ou afrouxamento da parede celular. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de verificar o desenvolvimento de aerênquima em plântulas de milho cv. Saracura- BRS 4154, submetidas à hipoxia. Associou-se, ao desenvolvimento dessa estrutura, a atividade da celulase. Para tanto, plântulas com 4 dias de idade foram submetidas aos tratamentos de hipoxia, pela imersão em tampão de alagamento, na ausência e presença de cálcio. Após 0, 1, 2, 3 e 4 dias da aplicação dos tratamentos, foram feitos cortes anatômicos na região apical dos coleóptiles e na região intermediária da raiz para a avaliação da formação de aerênquimas, e coletado o material para os ensaios enzimáticos de celulase. A atividade celulase foi medida através de método viscosimétrico. Nas raízes, a formação de aerênquima aumentou logo após a hipoxia e atingiu 50% do total do córtex ao quarto dia de hipoxia. Este órgão apresentou uma área cortical com aerênquima em média sete vezes maior que nos coleóptiles, onde a área de espaços intercelulares atingiu 15% do córtex. A atividade da celulase em coleóptiles e raízes sofreu, inicialmente, um decréscimo devido ao estresse, aumentando em seguida, acompanhando os resultados de aerênquima. Na presença de cálcio o desenvolvimento de aerênquima foi inibido; no entanto, a atividade enzimática foi induzida.

Palavras-chave: *Zea mays*, celulase, parede celular, cálcio

CALCIUM AND THE DEVELOPMENT OF AERENCHYMA AND CELULASE ACTIVITY IN CORN SEEDLINGS SUBJECTED TO HYPOXIA

ABSTRACT: Aerenchyma formation is known as one of the most important anatomical adaptations of plants submitted to oxygen shortage. This tissue develops by action of degrading enzymes and resulting in cell wall loosening. This work was conducted with the objective of verifying aerenchyma development in corn seedlings cv. Saracura - BRS 4154, submitted to hypoxia. The development of aerenchyma was observed in association to cellulase activity. The seedlings were submitted to the hypoxia treatments 4 days after germination, by immersion in a flooding buffer, in the absence and presence of calcium. After 0, 1, 2, 3 and 4 days under hypoxic conditions the evaluation of aerenchyma formation was made by transversal sections of coleoptiles apex, where the development of damages caused by hypoxia were also observed, and the intermediary region of roots. The material for the cellulase assays was collected after each of the hypoxia periods. The activity of cellulase was measured by the viscosimetric method. Aerenchyma formation in the roots increased immediately after the induction of hypoxia and reached 50% of the total cortex area at the fourth day of hypoxia. This organ presented an average aerenchyma area seven times higher than coleoptiles, where the area of intercellular spaces reached 15% of the cortex; cell injuries were observed on 65% of the total seedlings. Cellulase activity showed an initial decrease due to the forced stress, but subsequently increased along with the aerenchyma development. The presence of calcium apparently inhibited the aerenchyma development without affecting the enzymatic activity.

Key words: *Zea mays*, cellulase, cell wall, calcium

INTRODUÇÃO

Nas condições de solos inundados a difusão de O₂ se torna muito baixa, gerando uma diminuição da concentração deste gás (Kozłowski & Pallardy, 1984) e, como conseqüência, manifestam-se nas plantas vários distúrbios em seu metabolismo, reduzindo tanto o crescimento vegetativo como o reprodutivo (Kozłowski, 1997; Drew, 1997). Apesar da intensidade deste

estresse, 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 & Armstrong, 1987; Drew, 1997).

Aerênquima é uma especialização do tecido parenquimático em que se desenvolvem grandes espaços intercelulares preenchidos por gases, geralmente interligados, formando uma fase gasosa

contínua que se ramifica por todo o tecido (Mauseth, 1988). Esta estrutura, presente em folhas, pecíolos, caules e raízes surge por separação (esquizogenia) ou por lise de células (lisigenia) (Schussler & Longstreth, 1996), de maneira constitutiva ou em resposta a um estímulo ambiental. Déficit de oxigênio, causado por compactação (Sarquis et al., 1991; He et al., 1996a) ou encharcamento do solo (Drew et al., 1979; Justin & Armstrong, 1987) e deficiência temporária de nitrogênio e fósforo em ambientes aeróbicos (Drew et al., 1989; He et al., 1992), são as causas mais comumente citadas na literatura.

Mc Pherson (1939), um dos primeiros pesquisadores a estudar a formação de aerênquimas em raízes de milho alagadas, atribui ao colapso das células corticais decorrente da perda de turgidez celular a causa primária do desenvolvimento dos espaços intercelulares. Hoje, no entanto, sabe-se que a hipoxia estimula a produção de etileno (Kawase, 1972; 1974; Drew et al, 1989; He et al., 1996b) que, por sua vez, provoca a indução de enzimas que atuam no metabolismo da parede celular (He et al., 1996b) culminando na formação de aerênquimas.

Uma vez que o desenvolvimento dessas estruturas envolve também a lise celular, pesquisas têm sido direcionadas ao entendimento da participação de enzimas de degradação de parede celular durante este processo. De acordo com as enzimas envolvidas no desenvolvimento de aerênquimas, estas estruturas são classificadas em dois tipos (Schussler & Longstreth, 1996), a saber, de origem equizógena e lisígena. Aerênquimas de origem esquizógena são formados pela separação das células durante o desenvolvimento do tecido (Kawai et al., 1998), não ocorrendo, portanto, lise das células. As enzimas que atuam no seu desenvolvimento são enzimas de afrouxamento da parede celular como a xiloglucano *endo*transglicosilase (XET) (Saab & Sachs, 1996). Os de origem lisígena são identificados por restos de parede celular no tecido, indicando uma intensa lise de células (Kawase, 1979). A celulase, cuja atividade chega a aumentar até 16 vezes em raízes em ambientes hipóxicos, tem sido uma das mais estudadas (He et al., 1994). De acordo com He et al. (1996a) esta enzima faz parte de um complexo sistema envolvido na morte programada de células no córtex de raízes, cujas enzimas podem ser coordenadamente ativadas ou liberadas de compartimentos intracelulares antes da autólise. Observa-se então, que a atividade máxima da celulase coincide com a formação de aerênquima (Kawase, 1979), sendo totalmente perdida após a completa degradação da parede celular (Panavas et al., 1998). Estes autores não descartam, porém, o envolvimento de outras enzimas degradativas de parede celular em estádios iniciais deste processo. Até o momento, todas as pesquisas têm apontado o cálcio como mensageiro secundário na percepção do déficit de oxigênio, promovendo a expressão de genes anaeróbicos (Subiaiah et al, 1994; He et al, 1996b; Sachs et al., 1996).

A cultura do milho tem sua produtividade afetada pela baixa disponibilidade de oxigênio no solo. Por este motivo, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) desenvolveu uma cultivar tolerante ao encharcamento temporário do solo e a lançou no mercado em 1996 com a denominação de Saracura-BRS 4154 (Parentoni et al., 1997). Apesar de sua comprovada tolerância ao estresse hipóxico, existem poucos estudos que descrevem os mecanismos desta tolerância.

A partir da constatação da presença de aerênquima na cultivar de milho 'Saracura', objetivou-se, neste trabalho, verificar o desenvolvimento desta estrutura, associando-o à presença de cálcio e atividade de celulase.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste trabalho plântulas de milho cv. Saracura- BRS 4154. São características dessa cultivar o ciclo precoce, altura de planta por volta de 235 cm, altura de espiga 132cm, média de produtividade 5 a 6,5 t ha⁻¹, ótima resistência ao acamamento e ao quebramento, grão tipo semiduro e de cor laranja.

Cariopses de milho, após desinfecção com hipoclorito de sódio (5%) e Captan (0,5%), foram colocadas para germinar em rolos de papel (25 cariopses por rolo), embebidos em solução de CaCl₂ (0,76%) ou água destilada, em câmaras de crescimento a 27°C, no escuro. Após quatro dias as plântulas foram submetidas a 0, 1, 2, 3 e 4 dias de hipoxia, a 27°C no escuro. A hipoxia foi imposta às plântulas pela imersão de quatro rolos de germinação em recipientes com volume aproximado de 1,5 litros, preenchidos com tampão de alagamento contendo Tris-Hidroxi(metil)aminometano (5 mmol L⁻¹, pH 8,0) e ampicilina (25 mg mL⁻¹), na presença e ausência de CaCl₂ a 0,76%. O nível de hipoxia desejado (7%) foi atingido borbulhando-se nitrogênio durante três minutos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial de 5x2 com quatro repetições, sendo cinco períodos de hipoxia e dois níveis de cálcio.

Após os determinados períodos em hipoxia as plântulas foram fixadas em F.A.A. (5% Formol; 5% Ácido acético glacial; 90% Álcool etílico comercial), até a realização dos cortes anatômicos. Com auxílio de micrótomo manual, foram feitas seções transversais nas regiões apical de coleótilos e intermediária de raízes, corados com solução de safranina (0,1%) em água glicerina (50%). Foram feitas fotomicrografias dos materiais montados em lâminas semipermanentes.

A porcentagem de área de espaços intercelulares nos cortes foi estimada utilizando-se fotocópias das fotomicrografias, e determinando-se a relação entre o peso da área de espaços intercelulares e o peso da área total do córtex.

A extração e ensaio de celulase foi realizada de acordo com a metodologia proposta por He et al. (1996) com algumas modificações. Um grama de tecido vegetal das regiões apical de coleóptiles e intermediária de raízes foi macerado em 5 mL de tampão fosfato de potássio (0,02 mol L⁻¹, pH 6,1), com NaCl (1 mol L⁻¹). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 3600g por dez minutos. O sobrenadante foi armazenado a -80°C.

O extrato (1,5 mL) foi adicionado a um tubo de ensaio com 1,5 mL de carboximetil celulose sódica (CMC 1,5%). Foi medido o tempo de efluxo em 0,5 mL de uma pipeta de 1,0 mL, assim que o extrato foi adicionado ao tubo de ensaio e após duas horas de incubação em temperatura ambiente. A partir desses valores foi calculada a atividade de celulase, expressa em porcentagem de perda de viscosidade por peso de matéria seca. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento, sendo cada tubo uma repetição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até dois dias de hipoxia os espaços intercelulares ocuparam apenas 1% da área do córtex de coleóptiles de plântulas de milho (Figura 1a, b, c, d), sendo eles de origem esquizógena. A atividade de celulase durante este período se manteve constante (Figura 3a). A partir daí houve um aumento significativo na atividade desta enzima, indicado na Figura 3a. Esse aumento foi acompanhado pelo aumento na área de aerênquima, predominantemente de origem lisígena, que atingiu 3% ao terceiro dia, (Figura 1e), e 15% da área do córtex no quarto dia (Figura 1f). Nas raízes, a formação de espaços intercelulares e a atividade de celulase aumentaram logo no início da aplicação do tratamento (Figuras 2 e 3b). A área de aerênquima atingiu, após 12 horas de hipoxia, 12% do córtex (Figura 2b), mantendo-se inalterada até 24 horas (Figura 2c). A partir daí, sofreu um aumento gradativo, atingindo 24% a dois dias (Figura 2d), 32% a três dias (Figura 2e), e finalmente, 50% a 4 dias de hipoxia (Figura 2f). Neste órgão, a área dos espaços intercelulares foi, em média, sete vezes maior e a atividade de celulase, aproximadamente, 25% maior que na parte aérea, indicando uma forte lise celular. Atwell et al. (1988) e He et al. (1996) mostraram que raízes de milho com 15 e 5 dias de idade, respectivamente, submetidas a 2 dias de hipoxia, apresentaram um máximo de 13% de aerênquima.

Considerando-se que a presença de aerênquimas confere às plantas uma maior adaptação à baixa disponibilidade de oxigênio (Drew, 1997), estes resultados mostram que a cultivar 'Saracura' reagiu eficientemente a este estresse. A formação de aerênquima é vantajosa em plantas que se desenvolvem em ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio por diminuir a resistência de difusão desse gás entre órgãos aerados e não aerados (Drew, 1997).

Desta forma, ainda que o ambiente externo esteja hipóxico, ou mesmo anóxico, internamente a raiz encontra-se aerada. Quando aerênquimas não se desenvolvem, o déficit de oxigênio no interior da raiz permite a produção de ATP apenas pela rota fermentativa, que tem eficiência 18 vezes menor na produção de energia que o ciclo do ácido tricarboxílico (Taiz & Zeiger, 1991). A pequena quantidade de energia produzida nesta condição torna-se insuficiente para o desenvolvimento da planta e induz precocemente sua senescência (Yen & Yang, 1998).

Vitorino (1999) observou, porém, que a aplicação de cálcio retardou a lise celular em coleóptiles de milho sob hipoxia, possivelmente pelo seu efeito na manutenção da integridade da parede celular. Uma vez que a hipoxia estimulou a formação de aerênquimas lisígenos em raízes, aplicou-se cálcio a fim de verificar o seu efeito no desenvolvimento destas estruturas. O cálcio reduziu em cerca de 40% a presença de espaços intercelulares na parte aérea e raiz de plântulas submetidas a 24 horas de hipoxia (Figura 4). No entanto, este cátion induziu um aumento na atividade de celulase em até 50% (Figura 3).

Subaiah et al. (1994) e He et al. (1996) observaram que o déficit de oxigênio estimula o influxo de cálcio para o citosol, ativando genes importantes para o metabolismo anaeróbico como os genes da desidrogenase alcoólica e da celulase, respectivamente. Os últimos autores relatam que o maior desenvolvimento de aerênquimas ocorre a maiores concentrações de cálcio citosólico e que substâncias que reduzem essa concentração, provocam a inibição de enzimas que levam à formação lisígena dos espaços intercelulares. Portanto, segundo os autores, o aumento na concentração de cálcio intracelular estimulou a produção de etileno e este, por sua vez, ativou a síntese da celulase (He et al., 1996a e 1996b) que, ao atuar sobre a parede celular de células corticais de raízes de milho, promoveram um maior desenvolvimento de aerênquimas.

Nas pesquisas desenvolvidas por Subaiah et al. (1994) e He et al. (1996b) o cálcio estava livre no citosol e sua concentração variou entre 25 µmol L⁻¹ (concentração normal) e 150 µmol L⁻¹ (estresse). Nesta faixa de concentração, este elemento atua como um mensageiro secundário de processos celulares (He et al., 1996b; Subaiah et al., 1994).

Experimentos na área de pós-colheita há muito comprovam os efeitos positivos desse cátion, pela manutenção e integridade da parede celular, quando aplicados em concentrações de 16 mmol L⁻¹ a 66 mmol L⁻¹ (Gonçalves, 1998; Bicalho, 1998; Vitorino, 1999). Nestes casos, o cálcio promove ligações covalentes entre grupos carboxílicos de ácidos poligalacturônicos de pectinas (Jarvis, 1984). Conway et al. (1995) ressaltam que essas ligações tornam a parede celular menos acessível a enzimas responsáveis por sua degradação como a poligalacturonase (PG), mantendo sua

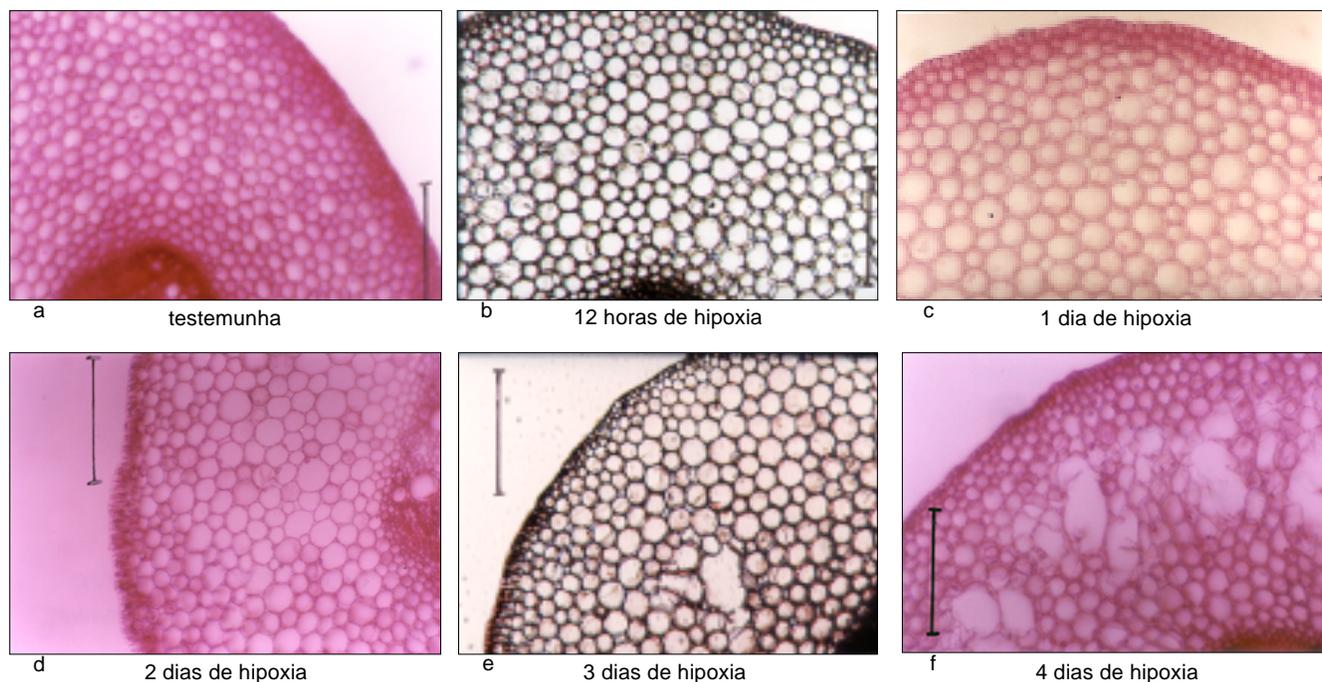


Figura 1 - Desenvolvimento de aerênquimas na região apical de coleótilos de plântulas de milho cv.Saracura - BRS 4154 submetidas a diferentes períodos de hipoxia. As barras nas fotomicrografias equivalem a $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$

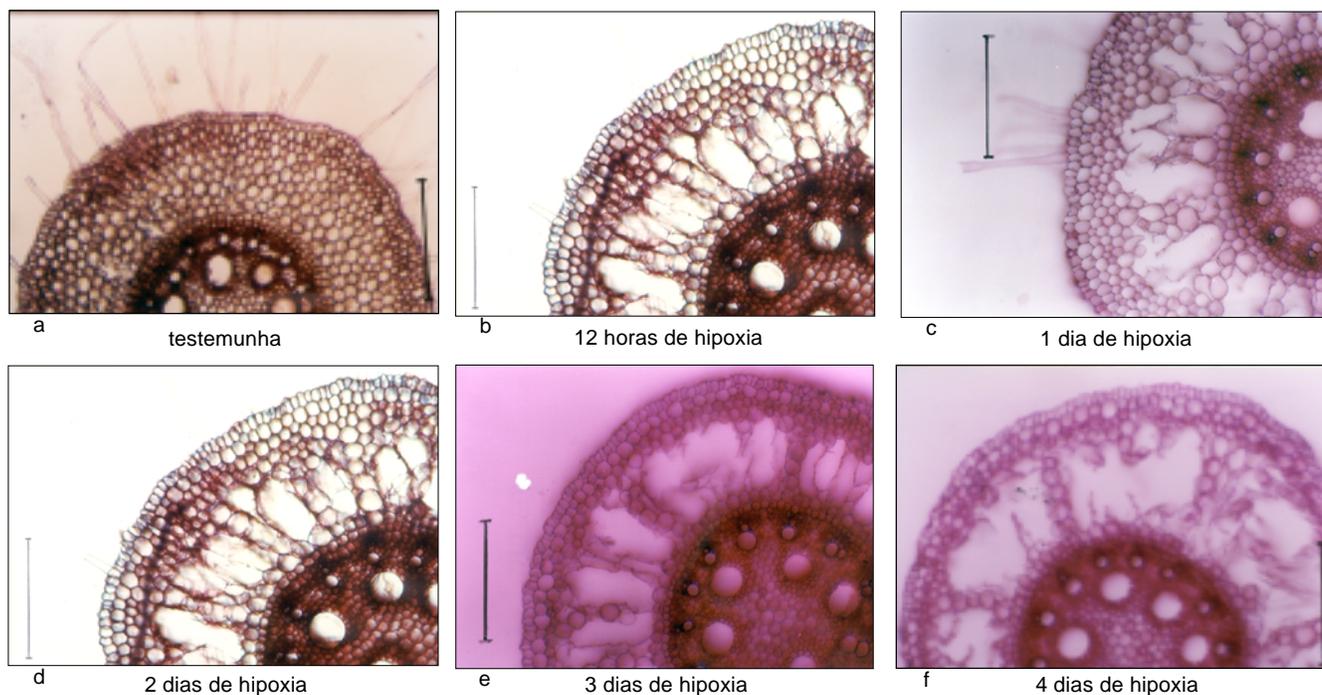


Figura 2 - Desenvolvimento de aerênquimas na região intermediária de raízes de plântulas de milho cv. Saracura - 4154 submetidas a diferentes períodos de hipoxia. As barras nas fotomicrografias equivalem a $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$

integridade. No presente experimento foi observado que o cálcio inibiu a formação de espaços intercelulares quando se aplicou exogenamente, 25 mmol L^{-1} do elemento (Figura 4). Como a hipoxia provoca “desarranjos” dos componentes da parede celular (Saab & Sachs, 1996), o cálcio possivelmente atuou como um elemento importante na manutenção da integridade

desta estrutura durante o período de hipoxia e, desta forma, evitou o colapso celular e o desenvolvimento da aerênquima. Estes resultados mostram que, em milho sob hipoxia, o cálcio, além do seu papel como mensageiro secundário na transdução do sinal externo em respostas metabólicas (Subaiah, et al., 1994), possui ainda importante função estrutural.

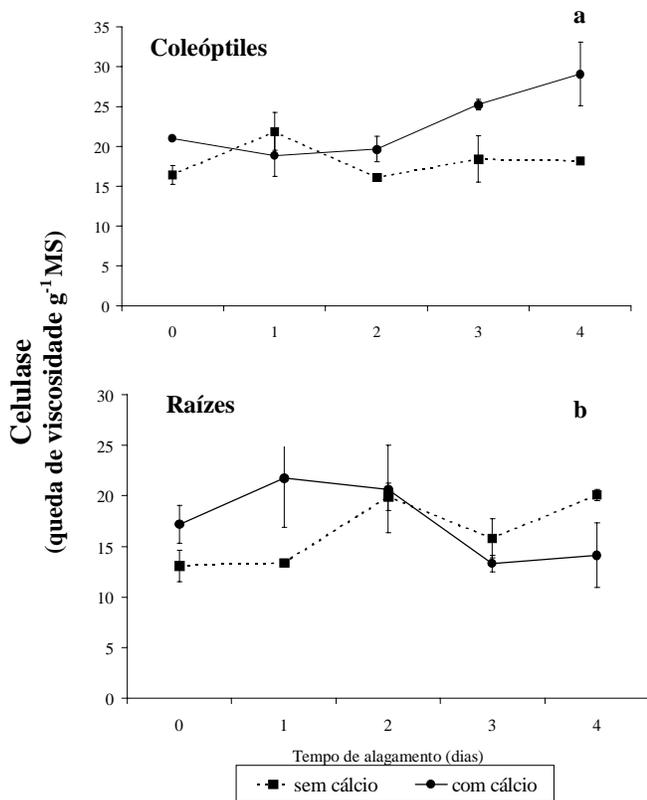


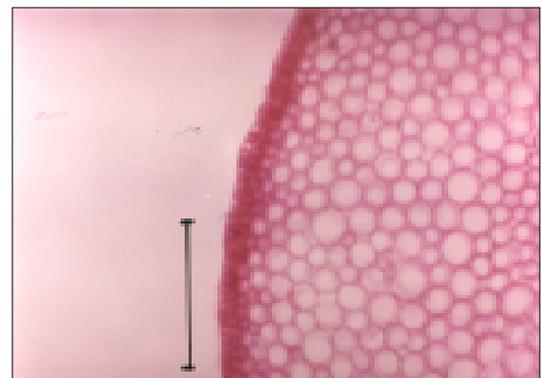
Figura 3 - Atividade de celulase nas regiões apical de coleóptiles e intermediária de raízes de plântulas de milho cv. Saracura-BRS 4154 submetidas a diferentes períodos de hipoxia. As barras verticais indicam o erro padrão da média; quando se sobrepõem, não há diferença estatística.

A maior atividade de celulase na presença do cálcio não resultou em maior desenvolvimento dos espaços intercelulares.

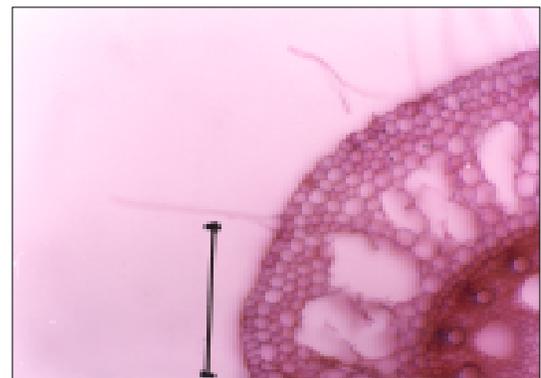
A aplicação de cálcio exógeno promove, de maneira geral, aumento tanto nos níveis deste elemento na parede celular como no citosol (Subaiah et al., 1994). Seguindo o raciocínio de He e seus colaboradores (He et al., 1996a; 1996b), a maior concentração deste elemento no citosol, provavelmente elevou a síntese das enzimas de parede celular induzidas pelo etileno. No entanto, *in vivo* o aumento no número de unidades de enzimas não foi suficiente para degradar a parede celular em tecidos tratados com cálcio, neste trabalho, devido à menor disponibilidade do substrato, explicando, desta forma, o pequeno desenvolvimento de aerênquima. Isso ocorre porque o cálcio, quando depositado na parede celular, forma pectatos de cálcio, aumentando a estabilidade da matriz pectica e diminuindo sua vulnerabilidade ao ataque pela poligalacturonase (Lima, 1992). Como a porosidade da parede celular é regulada pelas pectinas, sua menor degradação leva a um menor acesso das outras enzimas a seus substratos, diminuindo assim sua atividade *in vivo*. Observou-se, no entanto, que tecidos tratados com cálcio apresentaram maior atividade de celulase. Ao contrário do que ocorreu nas



a Coleoptile - sem cálcio



b Coleoptile - com cálcio



c Raiz - sem cálcio



d Raiz - com cálcio

Figura 4 - Efeito do cálcio no desenvolvimento de aerênquimas em plântulas de milho cv. Sacura - BRS 4154 submetidas a 1 dia de hipoxia. As barras nas fotomicrografias equivalem a $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

plântulas, os ensaios de atividade enzimática foram realizados *in vitro*, com o substrato prontamente disponível no meio de reação. Desta forma, a maior concentração dessas enzimas no extrato acarretou uma maior atividade enzimática (Figura 3). Este experimento indicou, portanto, que não existe uma relação direta e positiva entre atividades *in vivo* e *in vitro* das enzimas estudadas em função de diferenças na disponibilidade do substrato nos dois sistemas.

Como foi discutido anteriormente, aerênquimas são estruturas consideradas de adaptação de plantas a ambientes alagados. No entanto, a degradação da parede celular imposta por períodos prolongados de hipoxia, provoca uma lise excessiva de células na região apical de coleótilos que, em um estágio mais avançado, forma uma constricção, e com isto a morte das plântulas (Vitorino, 1999). A aplicação de cálcio exógeno retardou o aparecimento de danos na parte aérea e com isto garantiu uma maior percentagem de sobrevivência de plântulas, conforme observado por Vitorino (1999), ainda que as raízes apresentassem menor volume de aerênquimas.

CONCLUSÕES

A hipoxia induziu o desenvolvimento de grandes espaços intercelulares, formando aerênquima lisígeno, tanto em raízes como em coleótilos de plântulas de milho cv. Saracura- BRS 4154, devido ao aumento na atividade de celulase.

O fornecimento exógeno de cálcio a essas plântulas inibiu o desenvolvimento de aerênquima, no entanto induziu a maior atividade de celulase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATWELL, B.J.; DREW, M.C.; JACKSON, M.B. The influence of oxygen deficiency on ethylene synthesis, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels and aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.15-22, 1988.
- BICALHO, U.O. Vida útil de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de pvc. Lavras, 1998. 145p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.
- 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**, v.398, p.31-39, 1995.
- DREW, M.C. Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimatation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.223-250, 1997.
- DREW, M.C.; HE, C.J.; MORGAN, P.W. Decreased ethylene biosynthesis, and induction of aerenchyma, by nitrogen- or phosphate-starvation in adventitious roots of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, n.91, p. 266-271, 1989.
- DREW, M.C.; JACKSON, M.B.; GIFFARD, S. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. **Planta**, v.147, p.83-88, 1979.
- GONÇALVES, N.B. Efeito da aplicação de cloreto de cálcio associado ao tratamento hidrotérmico sobre a composição química e susceptibilidade ao escurecimento interno de abacaxi cv. Smooth cayenne. Lavras, 1998. 101p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.
- HE, C.J.; DREW, M.C.; MORGAN, P.W. Inductions of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* L. during hypoxia and nitrogen starvation. **Plant Physiology**, n.105, p.861-865, 1994.
- 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**, n.98, p.137-142, 1992.
- 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**, n.112, p.1679-1685, 1996a.
- HE, C.J.; MORGAN, P.W.; DREW, M.C.. Transduction of na ethylene signal required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation during hipoxia. **Plant Physiology**, n.112, p.463-472, 1996b.
- JARVIS, M.C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell and Environment**, v.7, p.153-164, 1984.
- JUSTIN, S.H.F.; ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of root and plant response to soil flooding. **New Phytologist**, v.106, p.465-495, 1987.
- KAWAI, M.; SAMARAJEWA, R.A.; BARRERO, M.; NISHIGUCHI, H.; UCHIMIYA, H. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation in rice roots. **Planta**, n.204, p.277-287, 1998.
- KAWASE, M. Effect of ethylene on aerenchyma development. **American Journal of Botany**, v.68, p.651-658, 1981.
- KAWASE, M. Role of cellulase in aerenchymas development in sunflower. **American Journal of Botany**, v.66, p.183-190, 1979.
- KAWASE, M. Role of ethylene in induction of flooding in sunflower. **Physiologia Plantarum**, v.31, p.29-38, 1974.
- KAWASE, M. Effect of flooding on ethylene concentration in horticultural plants. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, n.97, p.584-588, 1972.
- KOZLOWSKI, T.T. Responses of wood plants to flooding and salinity. <http://www.heronpublishing.com/tp/monograf/koslowiski.pdf>. (1997)
- KOZLOWSKI, T.T.; PALLARDY, S.G. Effect of flooding on water, carbohydrate and mineral relation. In: KOZLOWSKI, T.T. **Flooding and plant growth**. Orlando: Academic Press, 1984. p.165-188.
- LIMA, L.C.O. Bioquímica da parede celular de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Santa Clara: transformações e interação com o cálcio durante a maturação. Lavras, 1992. 100p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.
- MAUSETH, J.D. **Plant anatomy**. Menlo Park: The Benjamin/Cummings, 1988. 560p.
- MC PHERSON, D.C. Cortical air spaces in the roots of *Zea mays* L. **New Phytologist**, v.38, p.190-202, 1939.
- PANAVAS, T.; REID, P.D.; RUBISTEIN, B. Programmed cell death of dailily petals: Activities of wall-based enzymes and effects of heat shock. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, p.379-388, 1998.
- PARENTONI, S.N.; GAMA, E.E.; LOPES, M.A.; SANTOS, M.X.; GUIMARÃES P.E.O.; PACHECO, C.A.; SOUZA, I.R.P.; MEIRELES, W.; CORREA, L.A. Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54- Saracura. In: REUNIÃO DE MELHORISTAS DE MILHO NA AMÉRICA LATINA, Colombia. 1997. **Anais**. Bogotá, 1997.

- SAAB, I.N.; SACHS, M.M. A flooding-induced xyloglucanendo-transglycosylase homolog in maize is responsive to ethylene and associated with aerenchyma. **Plant Physiology**, v.112, p.385-391, 1996.
- SACHS, M.M.; SUBAIAH, C.C.; SAAB, I.N. Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize **Journal of Experimental Botany**, v.47, p.1-15, 1996.
- SARQUIS, J.I.; JORDAN, W.R.; MORGAN, P.W. Ethylene evolution from maize (*Zea mays* L.) seedling roots and shoots in response to mechanical impedance. **Plant Physiology**, v.96, p.1171-1177, 1991.
- SCHUSSLER, E.E.; LONGSTRETH, D.J. Aerenchyma develops by cell lysis in roots and cell separation in leaf petioles in *Sagittaria lancifolia* (Alismaceae). **American Journal of Botany**, v.83, p.1266-1273, 1996.
- SUBAIAH, C.C.; BUSH, D.S.; SACHS, M.M. Elevation of cytosolic calcium precedes anoxic gene expression in maize suspension cultured cells. **The Plant Cell**, v.6, p.1747-1762, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Reedwood: The Benjamin/Cummings, 1991. 565p.
- VITORINO, P.F.P.G. Caracterização da tolerância da variedade de milho Saracura- BR 154 a hipoxia, efeito do cálcio e modificações da parede celular. Lavras, 1999. 49p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.
- YEN, C.H.; YANG, C.H. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants. **Plant Cell Physiology**, v.39, p.922-927, 1998.

Recebido em 18.05.00