



KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE AERÊNQUIMAS E
ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM RAÍZES DE
MILHO SOB ENCHARCAMENTO**

LAVRAS – MG

2010

KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE AERÊNQUIMAS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA EM RAÍZES DE MILHO SOB ENCHARCAMENTO**

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

Orientador

Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS – MG

2010

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

Souza, Kamila Rezende Dázio de.

Desenvolvimento de aerênquimas e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento / Kamila Rezende Dázio de Souza. – Lavras : UFLA, 2010.

67 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Milho Saracura. 2. Antioxidante. 3. Hipoxia. 4. Anaerobiose.
5. Parede celular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.920410428

KAMILA REZENDE DÁZIO DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE AERÊNQUIMAS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA EM RAÍZES DE MILHO SOB ENCHARCAMENTO**

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

APROVADA em 29 de julho 2010.

Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart UNILAVRAS

Dr. Paulo César Magalhães EMBRAPA

Dr. Evaristo Mauro de Castro UFLA

Dr. José Donizeti Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2010

*À minha mãe e aos meus avós, exemplos em minha vida, pelo amor
incondicional...*

OFEREÇO

*À Fabi, Carla e Amanda, sinônimos de persistência, companheirismo e amizade,
por fazerem parte de minha vida...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, cuja providência e amor se fazem presentes em cada momento de minha vida.

À minha família, que respeitou minhas decisões, incentivou-me e, acima de tudo, apoiou-me para a realização de mais este sonho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e ao setor de fisiologia vegetal pela oportunidade de estudo e crescimento profissional e pessoal.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal e a todos os outros que participaram ativamente do meu processo de formação.

Ao meu orientador, Prof. José Donizeti, pelos ensinamentos, confiança, paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora Dr. Paulo César, Profa. Patrícia e Prof. Evaristo pela disponibilidade em participarem da banca de defesa e pela contribuição intelectual.

À EMBRAPRA Milho e Sorgo, na pessoa do Dr. Paulo César Magalhães, pela concessão das cariopses.

Ao Dr. Marcelo Murad pelo auxílio e pela valiosa contribuição.

Aos colegas Helbert e Meline pela amizade, disponibilidade e ajuda para a realização deste trabalho. À Mônica, Cinthia, Pedro, Lethícia e Gustavo pela ajuda na condução dos experimentos. À Paola e Neidiquele pela amizade.

Aos meus amigos, que sonharam comigo e, mesmo à distância, respeitaram minha ausência e estiveram ao meu lado, dando-me forças para continuar a caminhada.

Aos amigos Rogério, Michele, Brenda, Solange, Horllys, Melissa, Mariana, Angélica, que tornaram meus dias em Lavras mais felizes por estarem ao meu lado.

À Fabi, companheira de todas as horas, pela arte de ouvir e compreender.

Ao Fabrício e à Marinês pela amizade e pelo auxílio. À Heloísa Siqueira do Departamento de Ciência dos Alimentos pela valiosa ajuda nas análises enzimáticas.

À Nádia e à Brenda, companheiras de estudo do milho Saracura, pela convivência agradável, pela ajuda, pela parceria e horas de estudos.

Aos colegas de pós-graduação Thiago, Cynthia, Genáina, Ordilena, Dalilha, Leandro, Tânia, André, Jean, Vinícios, Luciene, Ariadne, Rafael, Christiane, Marilza e Aretusa pela convivência e pelo aprendizado em conjunto.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal Emmanuele, Joyce, Lena, Tanhan, Joel, Odorêncio, Barrinha e Evaristo pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todas as pessoas que contribuíram, de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, minha gratidão!

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos estudar as relações existentes entre o sistema antioxidante, atividade das enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular, aparecimento de aerênquimas e a tolerância de dois ciclos de seleção do milho Saracura ao encharcamento do substrato. Desta maneira, plântulas dos ciclos 1 e 18 do milho Saracura foram submetidas ao encharcamento do substrato no quarto dia pós-semeadura, quando apresentavam aproximadamente três centímetros de altura. As plântulas foram submetidas a diferentes tempos de encharcamento do substrato, sendo 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas para o ciclo 1 e 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas para o ciclo 18. As raízes foram coletadas e armazenadas para as análises enzimáticas e anatômicas. Também se realizou análise de crescimento durante o período de experimento, sendo utilizadas plântulas controle, com a umidade do substrato mantida próxima a capacidade de campo. As plântulas do ciclo 18 apresentaram características bioquímicas e fisiológicas que lhe conferem maior tolerância ao estresse anaeróbico. Embora em ambos os ciclos de seleção tenham ocorrido alterações no sistema enzimático e a formação de aerênquimas no córtex, as respostas apresentadas pelas plântulas do ciclo 18 foram mais intensas que do ciclo 1, por isso a maior taxa de sobrevivência após serem submetidas à hipoxia. Existe uma relação entre o sistema antioxidante, atuação de enzimas de parede celular e a formação dos aerênquimas em raízes de milho Saracura. Assim sendo, o processo de seleção do milho Saracura levou à existência de uma variedade com atributos favoráveis à sua sobrevivência em casos de estresse por hipoxia.

Palavras-chave: Milho Saracura. Antioxidante. Parede celular. Hipoxia. Anaerobiose

ABSTRACT

The present work had as objectives to study the existent relationships among the antioxidant system, enzyme activity of degradation and loosening of the cellular wall, aerenchymas appearance and the tolerance of two cycles of selection of Saracura maize to the substratum swampy. This way, plantules of the cycles 1 and 18 of Saracura maize were submitted to the swampy of the substratum at the fourth day after sowing, when they presented three centimeters of height approximately. The plantules were submitted to different times of swampy of the substratum, being 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours for the cycle 1 and 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 hours for the cycle 18. The roots were collected and stored for the enzymatic and anatomical analyses. The analysis of growth during the period of experiment was also performed, control plantules were used, with constant humidity of the substratum. The plantules of the cycle 18, presented biochemical and physiological characteristics that showed larger tolerance to the anaerobic stress. Although in both cycles the selection have provided alterations in the enzymatic system and the aerenchyma formation in the cortex, the answers presented by the plantules of the cycle 18 were more intense than of the cycle 1, providing the largest survival rates after they were submitted to the hypoxia. There is a relationship among the antioxidant system, performance of enzymes of cellular wall and the aerenchyma formation in roots of Saracura maize. Therefore, the process of selection of Saracura maize led to the existence of a variety with favorable attributes to its survival in cases of hypoxia stress.

Keywords: Saracura maize. Antioxidant. Cell wall. Hypoxia. Anaerobiosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Local de realização dos experimentos.....	23
3.2	Obtenção do material vegetal e imposição do encharcamento	23
3.3	Crescimento vegetativo.....	24
3.4	Atividade enzimática.....	24
3.5	Desidrogenase alcoólica.....	24
3.6	Enzimas do metabolismo antioxidante.....	25
3.6.1	Atividade das enzimas antioxidantes.....	25
3.7	Atividade da celulase.....	27
3.8	Atividade da poligalacturonase.....	27
3.9	Avaliações anatômicas.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5	CONCLUSÃO.....	56
	REFERENCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. Embora tenha parte de seu território voltado para o plantio desse cereal, ainda possui grande área sujeita ao alagamento do solo. O alagamento pode ter causas naturais, como tempestades ou antrópicas, como irrigação inadequada ou instalação de usinas hidrelétricas.

A ocorrência do alagamento exige alterações bioquímicas e morfológicas das plantas para sua sobrevivência e, diante disso, os cereais são os mais afetados sob condições de hipoxia. Por isso, há maior demanda agrônômica por cereais mais tolerantes ao alagamento do solo.

O milho (*Zea mays* L.) constitui uma cultura sensível ao excesso de água no solo. Assim sendo, e com vista na necessidade de maior produção, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu a variedade de milho Saracura BRS-4154, lançada no mercado em 1997. Estudos com diferentes ciclos de seleção do milho Saracura demonstraram os mecanismos bioquímicos e morfológicos que o levaram à maior tolerância à anaerobiose ao longo do processo de seleção.

A falta de oxigênio no meio leva a planta à aclimação bioquímica e morfológica, visando manter sua sobrevivência mesmo sob economia energética. Além da adequação ao metabolismo anaeróbico, é necessário que as plantas apresentem um sistema antioxidante eficaz para a proteção das células contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio formadas sob anaerobiose.

O sistema antioxidante eficiente na resposta à menor disponibilidade de oxigênio no meio é de extrema importância para a sobrevivência das plantas ao alagamento. Entretanto, os vegetais desenvolvem, além dos mecanismos bioquímicos, adaptações morfoanatômicas que lhe permitem maior sobrevivência à hipoxia. As principais modificações morfológicas são formação de aerênquimas, surgimento de raízes adventícias, hipertrofia de lenticelas,

maior suberização e lignificação de paredes celulares, podendo ocorrer a formação de barreiras apoplásticas na exoderme e na endoderme.

Aerênquimas mantêm o sistema de aeração da planta, permitindo maior tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio. Os aerênquimas podem ser de origem lisígena (morte celular) ou esquizógena (afastamento celular). A formação de aerênquimas se relaciona diretamente à indução da síntese de etileno pela ocorrência de estresse, levando à síntese de enzimas de degradação e afrouxamento celular, culminando em morte celular programada das células corticais e, finalmente o aparecimento destas câmaras para armazenamento de oxigênio.

Ainda que a indução por etileno seja uma das principais formas de sinalização para a ocorrência de morte celular programada nas células corticais, existe uma relação direta entre a formação de EROs e o surgimento de aerênquimas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos estudar as relações existentes entre o sistema antioxidante, atividade das enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular, aparecimento de aerênquimas e a tolerância de dois ciclos de seleção do milho Saracura ao encharcamento do substrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produção mundial de milho (*Zea mays* L.) está estimada em 805 milhões de toneladas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor desse cereal, precedido pelos Estados Unidos e pela China (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010). No Brasil, de acordo com o levantamento brasileiro da safra de grãos 2009/2010, a área cultivada com milho na primeira e segunda safras está estimada em 12,940 milhões de hectares. A produção esperada para a primeira safra de milho 2009/2010 é de 34,051 milhões de toneladas, enquanto para a safrinha a previsão é de que sejam colhidas 19,408 milhões de toneladas, num total de 53,459 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

É expressiva a extensão do território brasileiro voltada para a produção de milho, entretanto, o Brasil possui cerca de 28 milhões de hectares de solos com potencial agrícola que se encontram sujeitos ao encharcamento, ainda que temporário (SILVA, 1984). O alagamento pode ser provocado por fatores naturais como elevação dos níveis dos rios, ação de tempestades, cheias periódicas, drenagem inadequada do solo (KOZLOWSKI, 1997) ou, ainda, por ação antrópica direta (irrigação incorreta) ou indireta (aquecimento global).

O estresse por excesso de água leva a alterações metabólicas, interferindo na arquitetura e distribuição ecogeográfica das plantas (IRFAN et al., 2010). Assim sendo, as modificações na temperatura média do planeta tendem a agravar os problemas relacionados ao alagamento do solo num futuro próximo, seja pela variação no regime de chuvas ou pelo derretimento das geleiras e aumento nos níveis dos oceanos (INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONVENTION - IPPC, 2001). Tais alterações climáticas aplicarão pressão seletiva principalmente sobre agricultura de cereais (IRFAN et

al., 2010), que têm seu crescimento e sua produtividade afetados sob alagamento (JACKSON; COLMER, 2005). Consequentemente haverá maior demanda agrônômica por cereais mais resistentes ao alagamento do solo.

Diante da sensibilidade da cultura do milho ao excesso de água no solo, a Embrapa Milho e Sorgo desenvolveu a variedade de milho Saracura BRS-4154, lançada no mercado em 1997. O milho Saracura, após sucessivos ciclos de seleção massal em solos sob elevada umidade, revelou-se tolerante às condições hipóxicas de áreas sujeitas ao encharcamento do solo (PARENTONI et al., 1995). Essa variedade apresenta ciclo precoce, altura da planta em torno de 2,2 m, altura da espiga 1,2 m, produtividade média de 5 a 6,5 t/ha, média resistência ao acamamento e quebramento, grão do tipo semi-duro e cor laranja (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2010).

Inicialmente, Parentoni et al. (1995) verificaram, dentre outros atributos, aumento na porosidade radicular no quarto ciclo de seleção em relação ao primeiro. Estudos com diferentes ciclos de seleção do milho Saracura demonstraram os mecanismos bioquímicos e morfológicos que o levaram à maior tolerância sob anaerobiose (ALVES et al., 2002). Características tais como maior sobrevivência em relação à variedade sensível (VITORINO et al., 2001), aumento na porosidade radicular (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; FRIES et al., 2007; LOPES, 2005) e respostas do sistema antioxidante diante da continuidade do estresse (FRIES, 2006; LOPES, 2005) foram encontradas em plantas de milho Saracura submetidas ao alagamento. Dantas, Aragão e Alves (2001) relataram formação de aerênquimas lisígenos nas raízes de milho Saracura sob encharcamento, relacionada à maior atividade das enzimas de degradação e afrouxamento de parede celular, tais como celulase, poligalacturonase (PG) e xiloglucano endo-transglicosilase (XET).

O aumento da porosidade radicular ao longo dos ciclos de seleção do milho Saracura foi descrito por Pereira et al. (2008, 2010) e Souza et al. (2009),

que constataram a existência de maiores câmaras aeríferas nas raízes, permitindo aos últimos ciclos melhor tolerância ao encharcamento do solo.

A condição de encharcamento do solo proporciona uma condição de anoxia ou hipoxia, dependendo da disponibilidade de oxigênio. Plantas apresentam diferentes respostas ao excesso de água no solo, podendo tolerar desde horas até dias de estresse (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). Nessas condições, não há manutenção do metabolismo aeróbico e produção de energia suficiente para que a planta cresça adequadamente. A baixa taxa de difusão de oxigênio leva a planta, especialmente as raízes, a uma aclimação bioquímica anaeróbica, buscando manter taxas de metabolismo basal para sustentar sua sobrevivência sob economia de energia (IRFAN et al., 2010).

Diante da baixa disponibilidade de oxigênio, a planta inicia a rota fermentativa, com diminuição na produção de ATP e poder redutor, resultantes da respiração anaeróbica. Há o desencadeamento da expressão de proteínas específicas de estresse anaeróbico, os chamados polipeptídeos anaeróbicos (ANP) (KOZLOWSKI, 1984; LIAO; LIN, 2001). As proteínas anaeróbicas são, em sua maioria, relacionadas à glicólise e ao metabolismo de açúcares-fosfato, tais como aldolases, piruvato descarboxilase, enolases, glicose-6-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, sacarose sintase e álcool desidrogenase (SUBBAIAH; SACHS, 2003). A rota fermentativa não está presente em situações normais de metabolismo celular, porém a síntese de novo das enzimas relacionadas a essa via metabólica sugere ser este um mecanismo de sobrevivência da planta (DENNIS et al., 2000). Outras alterações metabólicas típicas de plantas sob hipoxia são o fechamento estomático, com redução na captação de CO₂; menor fotossíntese; menor absorção de nutrientes e translocação de carboidratos.

A ocorrência da respiração anaeróbica implica em potencialização da glicólise, uma vez que esta via produz menos energia (2 ATP) quando

comparada à via aeróbica (38 ATP). O baixo rendimento energético do metabolismo anaeróbico, geralmente, é compensado pela aceleração da glicólise, o chamado “efeito Pasteur”, para satisfazer às exigências por ATP (SUMMER; RATICLIFE; JACKSON, 2000). Em algumas plantas sob hipoxia, há uma eficiente mobilização de polissacarídeos de reserva, especialmente na parte aérea, promovendo aumento na taxa glicolítica nos tecidos. Entretanto, muitas espécies diminuem o metabolismo ao nível mínimo, apenas para a manutenção da sua sobrevivência.

Desta maneira, para compensar a maior demanda de NAD^+ para a glicólise, é necessário que outras enzimas, como a álcool desidrogenase (ADH), estejam atuantes. Inicialmente, a falta do oxigênio como acceptor final de elétrons na mitocôndria, reduz a atividade de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e ativa aquelas da rota fermentativa. A indução da lactato desidrogenase (LDH), leva à produção de lactato, que se acumula na célula, além de acarretar a redução do pH celular. A acidose celular leva à redução na formação de lactato e ativação da piruvato descarboxilase (PDC) e, conseqüentemente, da ADH, com produção de etanol. O etanol é um produto menos tóxico à célula e, de acordo com Vartapetian (2006), sua elevada produção está relacionada com a tolerância à hipoxia.

O estresse abiótico, assim como biótico, leva também à formação de espécies reativas de oxigênio. Em condições normais de oxigenação, há um equilíbrio entre os antioxidantes e as espécies reativas de oxigênio (EROs). Entretanto, a transição da planta de um estado de normoxia para hipoxia leva à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, tais como radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ASADA, 1999). A intensidade da resposta à anaerobiose dependerá da concentração de oxigênio no meio (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010).

As EROs, produzidas de maneira desordenada, atuam oxidando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podendo causar danos ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Os radicais O_2^- e OH^- possuem baixa mobilidade pela membrana celular e curto tempo de meia-vida, o que implica em elevada capacidade de reação e especificidade de sinalização destas EROs. Por outro lado, o H_2O_2 , uma espécie não-radical, possui habilidade de cruzar membranas celulares e maior tempo de meia-vida, o que possibilita agir como molécula sinalizadora do estresse oxidativo (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). Os radicais OH^- , que podem ser formados a partir de O_2^- ou H_2O_2 na reação de Haber-Weiss, são os mais reativos, sendo também considerados os iniciadores da peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 1993).

Há também a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) pela alteração do metabolismo mitocondrial e pelos polipeptídeos anaeróbicos. O óxido nítrico (NO) pode ser considerado uma molécula de sinalização do estresse, já que possui propriedades químicas favoráveis para penetrar a bicamada lipídica, sendo transportado na célula. O NO é produzido, em virtude da continuidade do estresse, pelas rotas enzimática ou não-enzimática, possui curto tempo de meia-vida e pode ser facilmente removido da célula. Esse composto pode reagir facilmente com o oxigênio, formando produtos tóxicos à célula e que participam também das rotas de sinalização de estresse. Os produtos da reação de NO com oxigênio, como o nitrito (NO_2), podem ser metabolizados pela redutase do nitrato citosólica e pela redutase do nitrito de membrana, que o converterá a NO sob hipoxia. Também mitocôndrias sob severa anoxia reduzem o NO_2 a NO (STHOR; STREMLAU, 2006).

A formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio é necessária para a indução da tolerância adaptativa, já que podem ser vistas como marcadoras de estresse e espécies sinalizadoras. Há controle em níveis transcricionais, traduçãois e metabólicos para evitar maiores danos causados

pela presença de EROs. A hipoxia induz os genes de neutralização ou utilização das EROs e aqueles relacionados às vias glicolítica (disponibilidade de piruvato) e fermentativa (liberação de NAD^+), além de promover ajustes no fluxo mitocondrial de elétrons (via óxido nítrico e balanço de EROs). Os pontos mais importantes são exatamente a economia de energia e o controle da formação de EROs (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). Quanto às ERNs, geralmente causam diferentes respostas na célula, tais como inibição de enzimas-chave do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA) e da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE). O controle de enzimas como a citocromo oxidase, aconitase e oxidase alternativa, mantém o *turnover* de NADH via cascata de reação hemoglobina-dependente e controla a formação de EROs (STHOR; STREMLAU, 2006).

Diante da maior produção de EROs e considerando-se os prejuízos causados pelos radicais livres, há necessidade de um sistema antioxidante composto por enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e por antioxidantes não enzimáticos, como ascorbato, glutatona e tocoferol. A formação de espécies altamente tóxicas é prevenida pela elevada expressão de antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (IRFAN et al., 2010).

A SOD é a primeira enzima do sistema antioxidante, já que realiza a dismutação dos íons superóxido, formando H_2O_2 . A função dessa enzima pode ser vista como protetora contra os danos oxidativos causados pelos radicais O_2^- (SCANDALIOS, 1993), de forma que está presente em todos os compartimentos celulares suscetíveis ao estresse oxidativo (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). A CAT é uma proteína que catalisa a dismutação do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Está presente predominantemente nos peroxissomos (FRUGOLI et al., 1996) podendo ser encontrada em outros compartimentos celulares.

A APX é a principal enzima do ciclo ascorbato-glutationa, que sequestra H_2O_2 , formando água como produto final. Essa enzima utiliza ascorbato como cofator enzimático, resultando na formação de dehidroascorbato. Esse é reciclado a ascorbato, sendo a glutatona reduzida (GSH) a doadora de elétrons, de forma que a glutatona oxidada (GSSG) seja convertida pela glutatona redutase (GR) dependente de NADPH (ASADA; TAKAHASHI, 1987). Está presente em cloroplastos e mitocôndrias, ou ainda no citosol e nos peroxissomos, apresentando alta afinidade pelo substrato (WILLEKENS et al., 1995). Possui inúmeras isoenzimas em tecidos vegetais, com diferentes funções e, dentre elas, a de controle na formação de EROs e sinalização de H_2O_2 celular.

A maior formação de EROs induz a síntese das enzimas antioxidantes que, ao atuar sobre essas espécies, atenuam o estresse (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). Plantas possuem diversas isoenzimas de SOD (SCANDALIOS, 1993), de CAT (FRUGOLI et al., 1996) e de APX (MIKA; BUCK; LÜTHJE, 2008) que podem ter diferentes funções no metabolismo celular (GOMES-JUNIOR et al., 2006). A ação combinada dessas três enzimas permite a conversão de radicais O_2^- e de H_2O_2 , prejudiciais à célula, em água e oxigênio molecular (O_2).

Aliados ao sistema enzimático estão os antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, tais como ácido ascórbico, tocoferol, glutatona e compostos fenólicos. O ácido ascórbico funciona como doador de elétrons em diversas reações enzimáticas e não enzimáticas, além de possuir outras funções nas células. O tocoferol é um antioxidante relacionado diretamente à proteção das membranas celulares, apresentando também outras funções que não antioxidantes. Os compostos fenólicos são compostos secundários amplamente presentes em plantas e com estrutura química favorável para sequestrar radicais livres (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

A presença de um sistema antioxidante eficiente na resposta à menor disponibilidade do meio é de extrema importância para a sobrevivência das plantas ao alagamento do substrato. Entretanto, os vegetais desenvolvem, além dos mecanismos bioquímicos, adaptações morfoanatômicas que lhes permitem maior sobrevivência à hipoxia.

Plantas sob encharcamento podem reagir economizando ATP e produzindo maior quantidade de compostos necessários ao metabolismo anaeróbico e às modificações pertinentes à situação de déficit de oxigênio, reduzindo o crescimento da parte aérea. Outras plantas reagem reorientando a direção de crescimento, além da formação de estruturas anatômicas favoráveis à difusão interna de oxigênio (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

De maneira geral, as principais adaptações das plantas submetidas à hipoxia são referentes às raízes e à parte aérea (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997). Raízes de plantas sob condições de alagamento tendem à formação de aerênquimas (EVANS, 2004; IRFAN et al., 2010; VODNIK et al., 2009), redução de pelos absorventes, ramificação e encurtamento, maior suberização e lignificação de paredes celulares, podendo ocorrer a formação de barreiras apoplásticas na exoderme e na endoderme (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Aerênquimas constituem uma especialização do tecido parenquimático, caracterizados por espaços intercelulares que mantêm o sistema de aeração da planta. São característicos de plantas de ambientes alagados, já que permitem maior tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio. Os aerênquimas podem ser constitutivos (determinação genética) ou induzidos por estímulos ambientais (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). O milho é uma espécie conhecida por formar aerênquimas em resposta a estímulos ambientais, como o estresse anaeróbico (LENOCHOVÁ; SOUKUP; VOTRUBOVÁ, 2009).

Os aerênquimas podem ser de origem lisígena (morte celular) ou esquizógena (afastamento celular). Embora com origens diferentes, em ambos os casos há formação de câmaras aeríferas, cujo desenvolvimento possui diferentes mecanismos de controle (GUNAWARDENA et al., 2001).

A esquizogenia é caracterizada pelo crescimento diferencial das células adjacentes, que são separadas umas das outras pela lamela média, ocorrendo na sua maioria em células corticais especializadas. Geralmente são aerênquimas constitutivos, podendo aumentar em algumas espécies quando sob hipoxia (EVANS, 2004). Aerênquimas esquizógenos estão presentes na constituição anatômica das raízes, caracterizando os meatos, ou seja, espaços intercelulares que ocorrem independentemente da existência de estresse (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Aerênquimas de origem lisígena são formados pela morte programada das células corticais, formando câmaras aeríferas. Embora com tamanhos variados e sem uma regularidade de forma, há manutenção de algumas camadas de células vivas para interligar os aerênquimas. Em milho tem sido demonstrada maior ocorrência de aerênquimas lisígenos (GUNAWARDENA et al., 2001; PEREIRA et al., 2008; SOUZA et al., 2009), que se formam desde o início da imposição do estresse (EVANS, 2004), como a hipoxia.

A baixa disponibilidade de oxigênio no meio é acompanhada pelo aumento nas concentrações de etileno nas células vegetais, principalmente em raízes (COLMER; VOESENEK, 2009). A síntese de etileno pode se dar também pelo mecanismo de *feedback* positivo (ALMEIDA; VRIEZEN; STRAETEN, 2003). Esse hormônio é o principal estímulo para a formação de aerênquimas lisígenos por meio de morte celular programada nas células corticais.

A biossíntese de etileno está associada à indução dos genes da ácido aminociclopropano carboxílico sintase (ACS) e ácido aminociclopropano carboxílico oxidase (ACO), sendo a atividade dessa última dependente da

presença de oxigênio, ainda que em níveis muito baixos. O ácido aminociclopropano carboxílico (ACC), em presença de ACO, origina o etileno, cuja síntese em situações de estresse determina o nível de tolerância da planta, já que esse hormônio está relacionado com a resistência ao estresse (EVANS, 2004; IRFAN et al., 2010). As modificações morfológicas que são diretamente controladas pelo etileno são formação de raízes adventícias, surgimento de aerênquimas e maior crescimento da parte aérea. Segundo Almeida, Vriezen e Straeten (2003), as raízes adventícias atuam na assimilação de água e minerais, além de auxiliar na ancoragem do vegetal, em caso de o estresse persistir.

A produção de ACC se inicia nas raízes e desencadeia o processo de morte celular programada no córtex radicular, constituindo uma estratégia de sobrevivência (SUBBAIAH; SACHS, 2003). Gunawardena et al. (2001) verificaram que a formação de aerênquima em raízes primárias de milho constitui um tipo único de morte celular programada. Xiong, Li e Li (2006) observaram que às 12 horas de hipoxia as células já apresentavam modificações internas, sinalizando ocorrência de morte celular.

He et al. (1996) estudando a formação de aerênquimas em raízes de milho, encontraram uma relação entre produção de etileno e atividade das enzimas ligadas à degradação de parede celular, como a celulase (HE; DREW; MORGAN, 1994). A presença do etileno também tem ligação com a produção de outras enzimas de metabolismo da parede celular, tais como xiloglucano endotransglicosilase (SAAB; SACHS, 1996), expansinas (VOESENEK et al., 2003) e pectinases (BRAGINA; RODIONOVA; GRINIEVA, 2003), todas envolvidas na formação de aerênquimas lisígenos.

Em termos gerais, a percepção do estresse é seguida pelo sinal de transdução, que leva à síntese de etileno, produção de celulase, degradação de parede celular e, finalmente, formação de aerênquimas (HE; DREW; MORGAN, 1994). A celulase, dentre outras enzimas de degradação de parede

celular, é produzida por células corticais vivas, marcadas pelo etileno para sofrerem autólise como resposta associada à morte celular programada (HE; DREW; MORGAN, 1996; SAAB; SACHS, 1996). Há, no entanto, relação direta entre atividade das enzimas de degradação de parede celular e aparecimento de aerênquimas.

A degradação enzimática da parede celular se inicia com a digestão dos polissacarídeos pécnicos contendo ácido poligalacturônico (RODIONOVA et al., 2001). Neste ponto, há atuação das pectinases, como a PG, que está relacionada diretamente com a permeabilidade da parede celular, realizando hidrólise das ligações α (1-4) entre dois resíduos adjacentes de ácido galacturônico (LYONS, 1973). A hidrólise dos arabinoglucuronoxilanos é realizada por enzimas como a endo-1,4- β -xilânase. Finalmente a celulase atua clivando ligações glicosídicas β (1-4) de moléculas de celulose ou carboximetilcelulose presentes na zona amorfa da parede celular (HE; DREW; MORGAN, 1996). Assim sendo, Bragina, Rodionova e Grinieva (2003) comprovaram a importância da atuação desses três tipos de enzimas para degradação da parede celular, formando aerênquimas e permitindo maior sobrevivência das plantas sob hipoxia.

Ainda que a indução por etileno seja uma das principais formas de sinalização para a ocorrência de aerênquimas nas células corticais, existe uma relação direta entre a formação de EROs (DREW, 1997), produção de NO e ocorrência de morte celular programada (EVANS, 2004; IRFAN et al., 2010).

Embora a formação de aerênquimas garanta maior oxigenação das plantas sob déficit de oxigênio, modificações morfológicas podem prevenir a perda do oxigênio armazenado, por exemplo, nas raízes. A ocorrência de deposição de lignina e suberina na epiderme e exoderme forma uma barreira contra a perda radial de oxigênio e de etileno pelas raízes (COLMER, 2003). Essa barreira garante também melhor transporte de oxigênio nas raízes sob anaerobiose (EVANS, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos de germinação e indução de hipoxia foram realizados em sala de crescimento, enquanto as análises enzimáticas ocorreram no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia. Análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Central de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos e as avaliações anatômicas ocorreram no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia, na Universidade Federal de Lavras.

3.2 Obtenção do material vegetal e imposição do encharcamento

As cariopses de milho Saracura BRS-4154 dos ciclos 1 e 18, gentilmente cedidas pela Embrapa Milho e Sorgo, foram semeadas em bandejas de polipropileno contendo vermiculita, em uma profundidade de aproximadamente 1 cm da superfície. Cada bandeja continha cerca de 80 cariopses.

No quarto dia pós-semeadura, as plântulas com 2 a 3 cm de altura foram submetidas à condição de hipoxia pelo encharcamento do substrato mediante manutenção de uma lâmina de água de aproximadamente 1 cm acima do substrato.

Os tratamentos constituíram-se de diferentes períodos de encharcamento: para o ciclo 1 foram 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e para o ciclo 18 os tratamentos foram 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Plântulas controle, irrigadas e com drenagem livre, foram utilizadas para cada um dos tratamentos.

O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura variando entre 25 e 30°C e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

3.3 Crescimento vegetativo

A análise de crescimento foi realizada pela obtenção dos comprimentos da raiz e parte aérea das plântulas. Para a parte aérea foi medido o comprimento entre o coleto e o ápice foliar, enquanto, para raízes, entre o coleto e o ápice da raiz primária. Além disso, foi também quantificada a matéria seca de raiz e parte aérea dessas plântulas.

3.4 Atividade enzimática

As raízes coletadas para extração enzimática foram lavadas em água corrente para completa remoção da vermiculita e, em seguida, uma amostra de 3g de raízes primárias por repetição foi acondicionada em papel alumínio e mergulhada em nitrogênio líquido. Posteriormente, as raízes foram armazenadas a -80°C até as análises.

3.5 Desidrogenase alcoólica

Para a atividade da desidrogenase alcoólica (ADH), 0,2 g de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados em tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), glicerol 15% (v/v), β-mercaptoetanol 10 mM e PVPP 6% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g, por 15 minutos, a 4°C, coletando-se o sobrenadante para a incubação (YAMANOSHITA et al., 2005). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram

adicionadas a um tampão de incubação específico para cada enzima. O tampão de incubação para a ADH foi composto por Tris-HCl 150 mM (pH 8,0) e NAD^+ $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, incubando-se a 30°C , por 15 minutos, adicionando-se 1% de etanol (v/v) na hora da leitura, realizada em espectrofotômetro, a 340 nm, durante três minutos, acompanhando-se a redução do NAD^+ . O cálculo da atividade enzimática foi dado pela quantidade de NADH produzido por minuto de incubação.

3.6 Enzimas do metabolismo antioxidante

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,3g de raízes, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 μL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 6 μL de DTT 0,5 M, 12 μL de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT et al., 1998), assim como nos géis de atividade da SOD.

3.6.1 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 100 μL do extrato enzimático a 1,9 mL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . Os

tubos contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático foi adicionada a 950 μL do meio de incubação contendo 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 50 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático foi adicionada a 950 μL de tampão de incubação composto por 500 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 50 μL de ácido ascórbico 10 mM e 50 μL de peróxido de hidrogênio 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para a diferença entre os tratamentos foi utilizado o teste de F, enquanto o teste para diferença entre as médias foi o de Scott e Knott (1974) a 0,05.

3.7 Atividade da celulase

A atividade da celulase foi determinada de acordo com Walker et al. (2006) com modificações. A obtenção do extrato enzimático ocorreu pela maceração de 0,3 g de matéria fresca em nitrogênio líquido e sequente adição de 1,5 mL de NaCl 1 M. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e sobrenadante foi coletado para a atividade enzimática.

A 400 µL do extrato enzimático foram adicionados 400 µL de carboximetil-celulose 1% (m/v), procedendo-se a incubação em banho-maria 30°C por 1 hora. Em seguida, fez-se a desproteíntização das amostras pela adição de hidróxido de bário 0,3 N, sulfato de zinco 5% e água. Procedeu-se a centrifugação das amostras a 8000 g para separação do desproteíntizado. A determinação da atividade de celulase se deu pelo método do DNS (MILLER, 1959), em que a diferentes alíquotas das amostras desproteíntizadas foram adicionados 400 µL de DNS com posterior fervura por 10 minutos e leitura da absorbância a 540 nm. Uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima requerida para quebrar 1 µmol de açúcares redutores por hora.

3.8 Atividade da poligalacturonase

A extração da poligalacturonase foi realizada segundo a técnica de Buescher e Furmanski (1978) com modificações de Vilas-Boas (1995). O doseamento foi realizado segundo Markovic, Heinrichová e Lenkey (1975) com modificações de Vilas-Boas (1995).

O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 1,5 g de matéria fresca em nitrogênio líquido e posterior adição de 5 mL de NaCl 1 M. Ao extrato

enzimático foi adicionado 1 mL de pectina cítrica 0,25%, deixando em banho-maria a 30°C por 3 horas. A reação foi paralisada por 5 minutos de fervura das amostras. A seguir, realizou-se a desproteinização das amostras com hidróxido de bário 0,3N, sulfato de zinco 5% e água. Após filtração, alíquotas do desproteinizado foram utilizadas para determinação da atividade enzimática pelo método de Somoghi-Nelson (NELSON, 1944). A atividade foi expressa em ηmol de ácido galacturônico $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

3.9 Avaliações anatômicas

Para avaliação anatômica, as raízes de plântulas do milho Saracura foram coletadas, fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70%) por 72 horas e armazenadas em etanol 70% (KRAUS; ARDIUM, 1997).

Os cortes transversais foram realizados no segundo centímetro da zona pilífera da raiz primária, em micrótomo de mesa. As secções transversais foram clarificadas em hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos e coradas com safrablau (safranina 7,5 : azul de astra 2,5). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina 50% (KRAUS; ARDIUM, 1997). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Olympus BX-60 acoplado a uma câmara digital Canon Poxer Shot A620.

As medições dos padrões anatômicos analisados foram realizadas pelo programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool. Para determinação do dado final utilizou-se a média de três raízes para cada uma das repetições dos tratamentos. Para a diferença entre os tratamentos foi utilizado o teste de F, enquanto o teste para diferença entre as médias foi o de Scott e Knott (1974) a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plântulas do ciclo 1 (plântulas C1) a atividade radicular da ADH permaneceu inalterada até 12 h de encharcamento. Em seguida, aumentou até 72 h decrescendo, até o final do experimento, em níveis ainda superiores aos do controle (Gráfico 1). No ciclo 18, a atividade da enzima aumentou desde as primeiras 6 h até às 72 h de estresse, quando então caiu até o final do experimento (Gráfico 2).

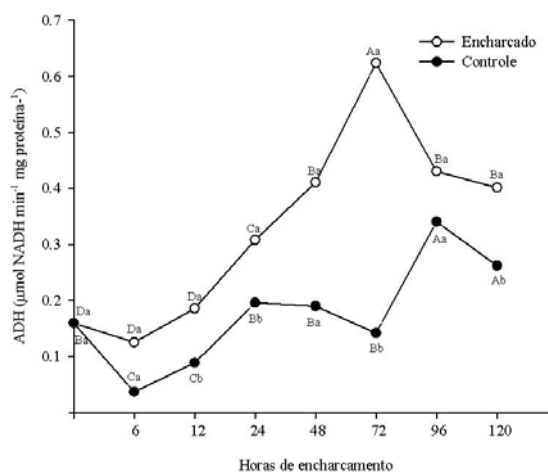


Gráfico 1 Atividade da ADH em raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 1 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

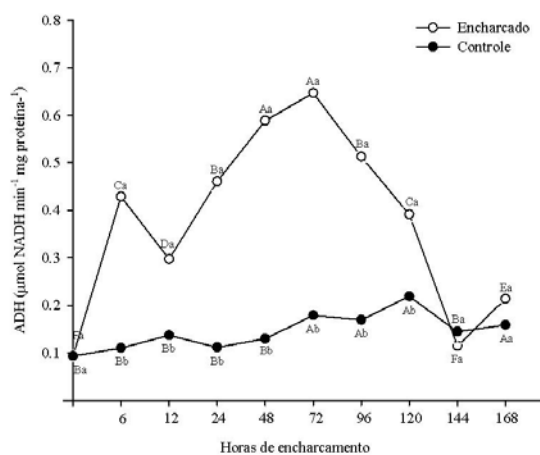


Gráfico 2 Atividade da ADH em raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 18 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

De maneira geral, os valores de atividade da ADH nas raízes das plântulas de ambos os ciclos foram semelhantes entre si. Entretanto, observa-se uma resposta precoce nas plântulas do ciclo 18 (plântulas C18) com a elevação da atividade dessa enzima já às 6 horas de encharcamento. Nas plântulas C1, esta elevação ocorreu só às 24 horas. Esses resultados demonstram que as plântulas C18 respondem mais rapidamente ao déficit de oxigênio, desviando seu metabolismo para a via anaeróbica. A queda na atividade da ADH, para as plântulas de ambos os ciclos, nas últimas avaliações, provavelmente tenha ocorrido em função de um esgotamento das reservas de carboidratos, uma vez que a produção de tais substratos para essa enzima estava comprometida pelo encharcamento.

De acordo com Drew (1997) e Kumutha et al. (2008), plantas que desviam seu metabolismo para a respiração anaeróbica possuem maiores condições de tolerar o estresse por manterem a produção de um mínimo de

energia (produção de ATP e NADH) necessária aos seus processos vitais. Desse modo, pode-se inferir que com a evolução dos ciclos de seleção do milho Saracura, ele adquiriu mecanismos bioquímicos que aumentam a eficiência das plantas para suportar o estresse anaeróbico.

Fries (2006) observou que a atividade da ADH em raízes do ciclo 17 do milho Saracura aumentou, a partir de 3 horas de alagamento. Também Andrews et al. (1993) observaram elevação da atividade dessa enzima já às 6 horas de estresse em uma variedade de milho tolerante à hipoxia.

Em relação ao crescimento das plântulas, durante todo o período experimental não foram observadas variações significativas no comprimento das raízes das plântulas C1 (Gráfico 3) e C18 (Gráfico 4). Por outro lado, em relação à matéria seca, observou-se nas plântulas C1 um aumento apenas às 120 h, enquanto nas C18 esse aumento ocorreu já às 96 h e se manteve crescente até as 168 h de encharcamento.

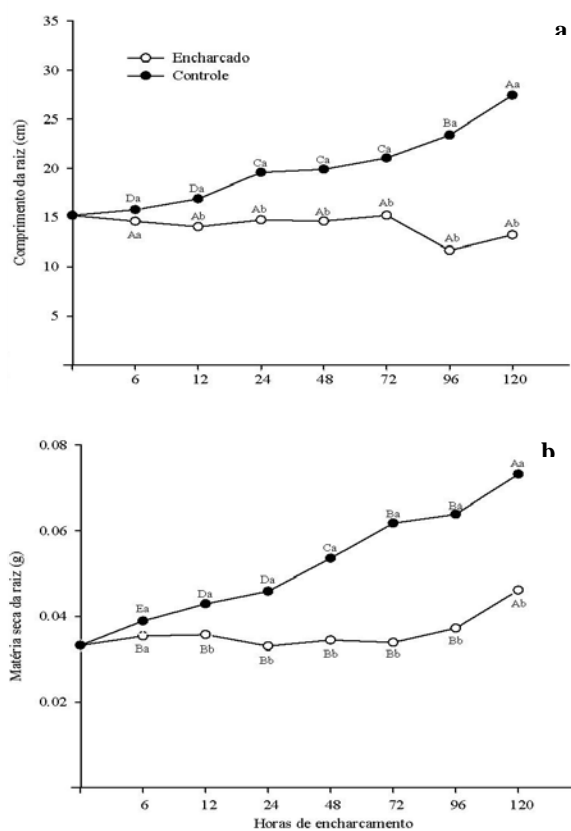


Gráfico 3 Crescimento (a) e matéria seca (b) de raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 1 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

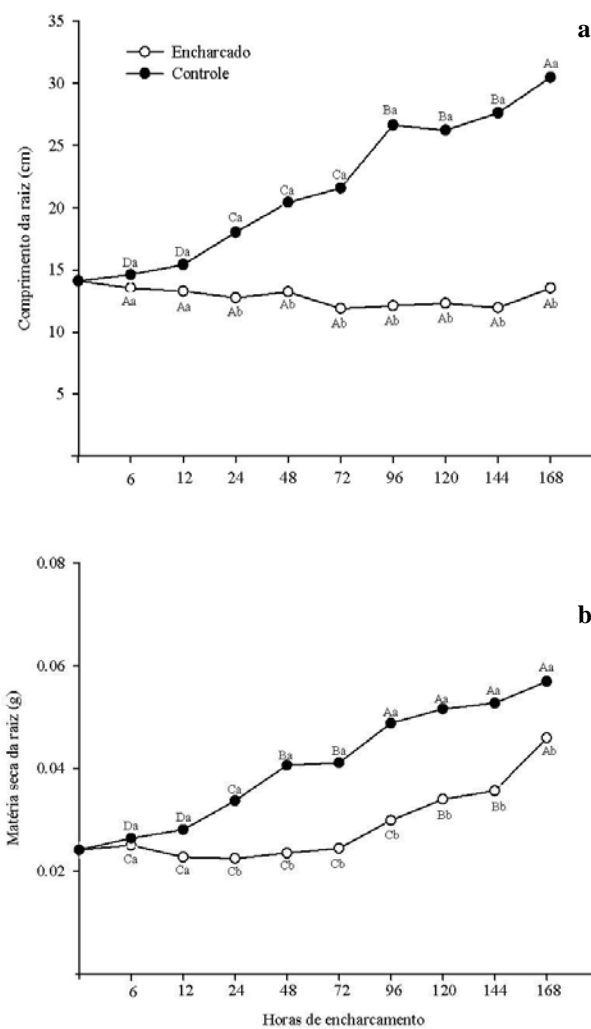


Gráfico 4 Crescimento (a) e matéria seca (b) de raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 18 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

No que se refere à parte aérea, nas plântulas C1 não foi observada nenhuma variação na altura das plântulas encharcadas até 12 h de tratamento (Gráfico 5). A partir daí, essas plântulas mantiveram seu crescimento até as 120 horas. As plântulas C18 sob encharcamento começaram a crescer em altura após 24 h de estresse (Gráfico 6). Esse crescimento permaneceu ativo até as 120h, quando então se manteve até as 168 horas. Quanto à matéria seca, houve um aumento da mesma às 24 h de tratamento para as plantas C1 e às 48 h para as C18, sendo que em ambos os ciclos esse aumento permaneceu até o final das avaliações.

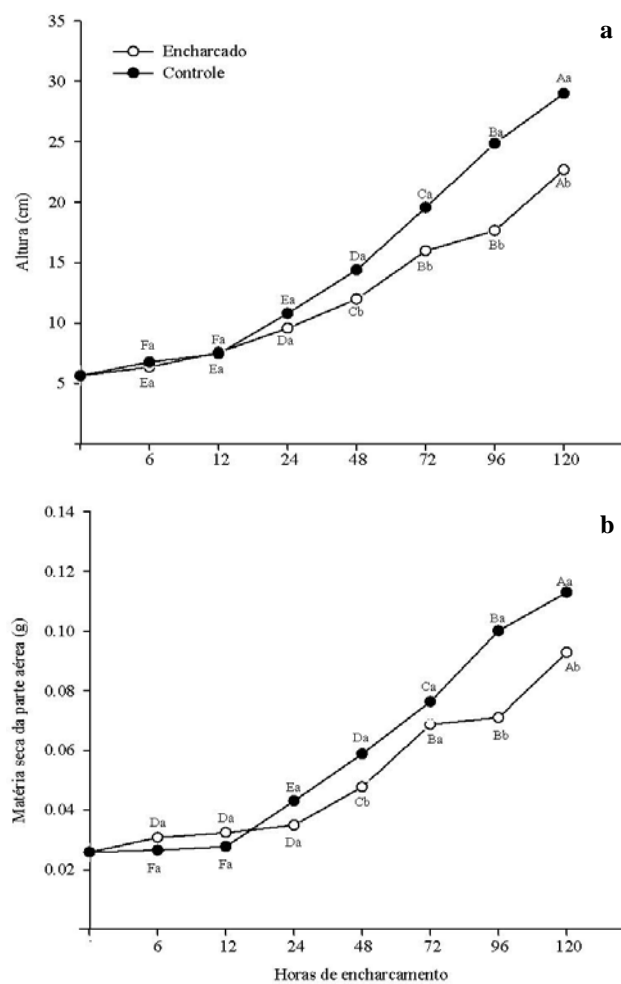


Gráfico 5 Crescimento (a) e matéria seca (b) da parte aérea de plântulas de milho Saracura do ciclo 1 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

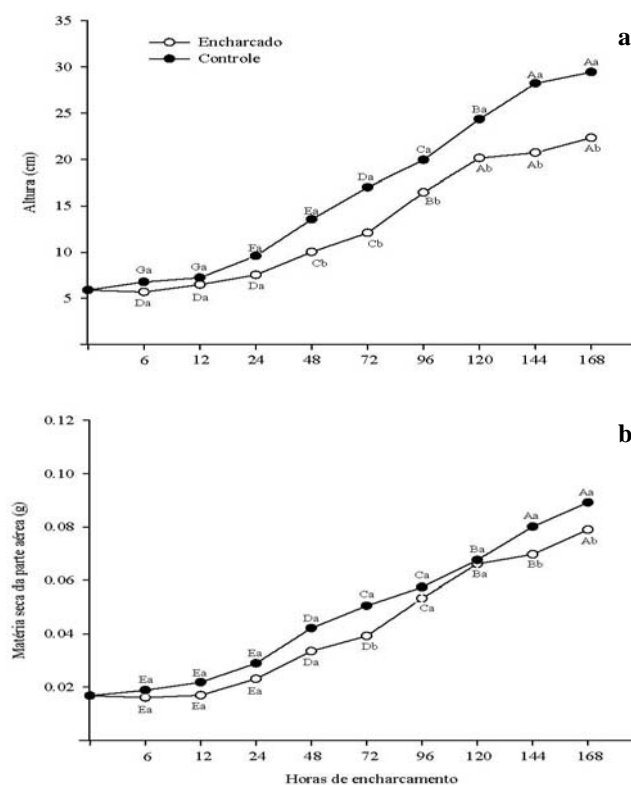


Gráfico 6 Crescimento (a) e matéria seca (b) da parte aérea de plântulas de milho Saracura do ciclo 18 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A baixa disponibilidade de oxigênio no ambiente interferiu diretamente no metabolismo das plantas, sendo as raízes os órgãos primariamente afetados sob tal estresse (MANO et al., 2006). O encharcamento do substrato promoveu, em relação às plântulas controle que cresceram durante todo o período experimental, uma paralisação no crescimento em extensão das raízes nas plântulas C1 e C18. Por outro lado, quanto à matéria seca das raízes, foi possível

diferenciar plântulas C1 de C18 ao observar-se que estas últimas reassumiram seu crescimento sob anaerobiose 24 h antes que as primeiras. Esse fato pode ser atribuído à maior energia disponível para o crescimento em plântulas C18, visto que a atividade da ADH nestas plântulas se elevou já nas primeiras horas de estresse.

O desvio na rota do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, proporciona, um rendimento líquido de 2 ATPs por molécula de glicose. Esta energia, 18 vezes menor que aquela produzida por plantas sob normoxia, é essencial para manter o metabolismo em nível basal e, desse modo, permitir às plantas sob déficit de oxigênio que mantenham seu crescimento, ainda que em menores taxas que em situações normais de oxigenação (IRFAN et al., 2010). Quanto à parte aérea, de maneira geral, ambos os grupos de plântulas apresentaram o mesmo comportamento.

O crescimento reduzido das raízes neste estudo corrobora com os resultados encontrados por Lenchová, Soukup e Votrubová (2009), em que variedades de milho sob tratamentos com baixa disponibilidade de oxigênio apresentaram menor crescimento. Também Lizasso, Melendez e Ramirez (2001) e Mano et al. (2006), constataram menor crescimento de raízes de milho alagadas em relação àquelas do controle.

Embora em proporções menores que o controle, a parte aérea de plântulas encharcadas manteve um padrão de crescimento mesmo sob estresse, enquanto o comprimento das raízes não se alterou neste mesmo período.

Ainda que em ambos os ciclos de seleção tenha havido menor crescimento e acúmulo de matéria seca em plântulas alagadas que no controle, os mesmos apresentaram sobrevivência diferenciada após reaeração. Plântulas C18 apresentaram 100% de sobrevivência tolerando até três semanas pós-estresse, enquanto que para as C1 a taxa de sobrevivência foi de apenas 40%. Neste caso, as plântulas do ciclo mais avançado cresceram continuamente,

porém em taxas menores que aquelas do ciclo inicial, apresentando um maior vigor vegetativo, caracterizado por maior enverdecimento das folhas e caules mais espessos. Já as plântulas C1, que apresentaram maior taxa de mortalidade, mostraram-se cloróticas, necrose nas extremidades foliares e tombaram. Vitorino et al. (2001), estudando plântulas dos primeiros ciclos de seleção do milho Saracura, verificaram formação de uma constrição em mesocótilos, causando tombamento dos mesmos aos 4 dias de alagamento.

Neste estudo, a redução do crescimento de raízes encharcadas em relação às do controle no ciclo 1 ocorreu às 12 h de estresse, enquanto nas C18 se deu às 24 h. Tal fato demonstra a eficiência das plântulas do ciclo 18 em prevenir ou retardar os danos às suas raízes, já que, embora a atividade das enzimas antioxidantes já esteja elevada desde as 6 horas de alagamento, as modificações morfológicas só ocorreram horas depois.

Com relação ao sistema antioxidante, em raízes de plântulas C1 sob alagamento, a atividade da SOD se manteve baixa até 24h de encharcamento, quando então foi estimulada, mantendo-se em níveis elevados até 120 h de estresse (Gráfico 7a). Quanto à APX, aumento significativo na sua atividade foi detectado já a partir de 6 h (Figura 7b). A taxa de atividade continuou crescente até 48h de imposição do estresse, sofrendo uma pequena queda nas três avaliações seguintes. A CAT não mostrou um padrão definido, ora aumentando ora diminuindo, de modo que às 96h de anaerobiose sua atividade era semelhante àquela observada no início das avaliações (Figura 7c). Vinte quatro horas depois, a atividade desta enzima aumentou significativamente em três vezes.

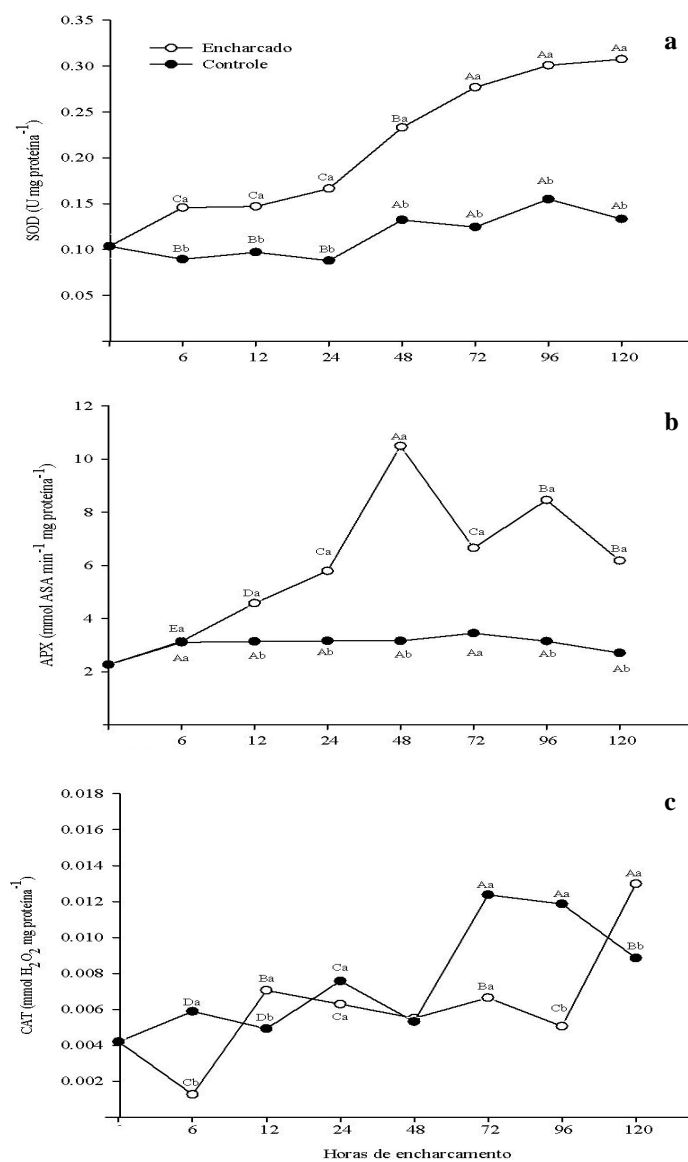


Gráfico 7 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (a), APX (b) e CAT (c) em raízes de plântulas milho Saracura do ciclo 1 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Nas raízes de plântulas C18 observou-se que, de maneira geral, a atividade da SOD aumentou do tempo zero até 144 h de encharcamento, caindo subitamente na última avaliação (Gráfico 8a). Já a atividade da APX permaneceu constante até 48 h de tratamento, aumentou nas próximas 24 h e manteve-se constante até 144 h, vindo a aumentar na última avaliação (Gráfico 8b). Para a CAT, observou-se que sua atividade aumentou às 6 h de encharcamento, manteve-se oscilando até 96 h e, a partir daí, apresentou uma redução, atingindo um nível semelhante ao observado no tempo zero (Gráfico 8c).

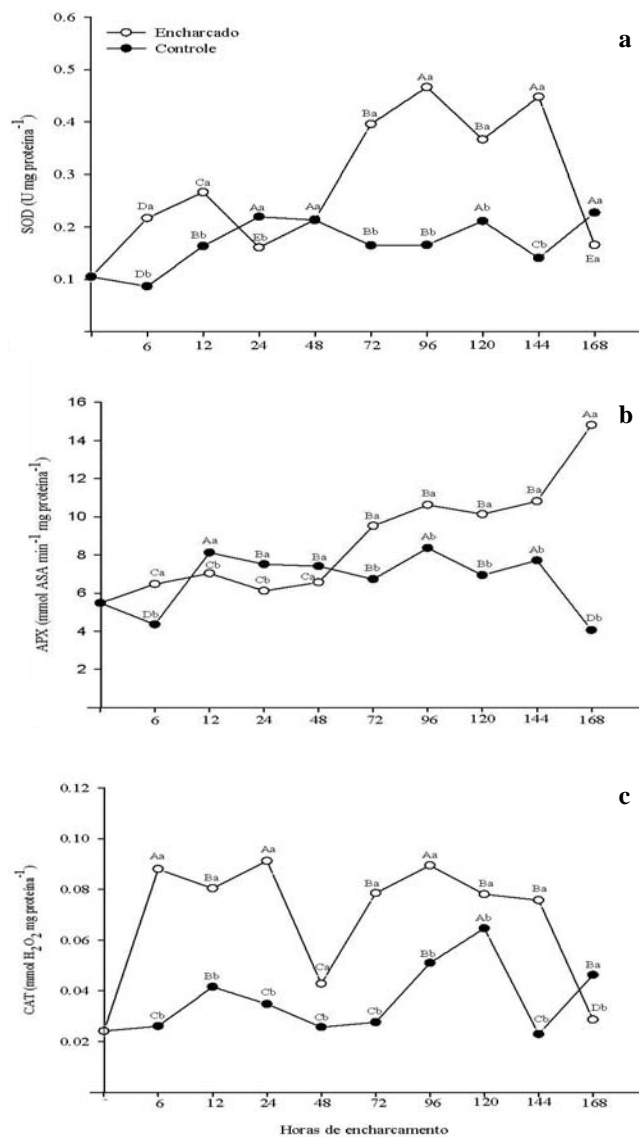


Gráfico 8 Atividade das enzimas antioxidantes SOD (a), APX (b) e CAT (c) em raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 18 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Embora tenha ocorrido elevação na atividade enzimática nas raízes de plântulas sob encharcamento (Gráficos 7 e 8), no gel não foi possível essa visualização. Esses resultados mostram que a ativação do metabolismo antioxidante nestas raízes, aqui relacionado com a SOD, não ocorreu devido ao aparecimento de novas isoformas durante o período de alagamento e sim a uma maior eficiência na sua capacidade de degradação dos radicais O_2^- . No presente caso, em que se caracteriza uma situação de estresse de oxigênio, uma maior atividade da SOD deve estar relacionada à maior tolerância a anaerobiose.

Fries (2006), trabalhando com o milho Saracura do ciclo 16, verificou a existência de três isoformas em raízes de plantas em diferentes períodos de alagamento, sem, no entanto, aumentos da atividade no gel. A SOD pode apresentar variações em sua expressão, sintetizando diferentes números de isoformas de acordo com o tecido, com a espécie e o tipo de estresse a que a planta está submetida (GOMES-JUNIOR et al., 2006; ZANANDREA, 2009).

A elevada atividade da ADH, uma enzima considerada marcadora do metabolismo anaeróbico, demonstrou que em plântulas C18 o estresse por anaerobiose foi detectado às 6 horas de encharcamento (Gráfico 2). Nesse mesmo período as enzimas antioxidantes APX, SOD e CAT também apresentavam maior atividade em relação ao controle, atuando na proteção contra o estresse oxidativo (Gráfico 8). Em contrapartida, a atividade da ADH demonstrou que plântulas C1 sofreram a influência negativa da anaerobiose às 24h (Gráfico 1). Entretanto, foi observado que nas primeiras horas de estresse, antes que o mesmo fosse constatado pela ADH, houve resposta imediata do sistema antioxidante, notadamente formado pela APX e SOD (Gráfico 7).

De maneira geral, a exposição ao encharcamento resultou em alterações diferenciadas nas atividades das enzimas nas raízes das plântulas dos ciclos 1 e 18. Tais diferenças ocorreram exatamente pela resposta precoce e em níveis mais elevados apresentada pelas raízes do ciclo 18. Nessas plântulas atividades

mais elevadas foram encontradas para a SOD, APX e CAT, caracterizando a eficiência fisiológica para controle das EROS em raízes destas plantas do milho Saracura. O produto da atividade da SOD é o H_2O_2 , que também é muito tóxico para as células, mas pode ser eliminado por reações espontâneas ou catalisadas por peroxidases e/ou catalases. Eventualmente, os radicais $O_2^{\cdot -}$ e o H_2O_2 podem ser utilizados como substratos para a reação de Haber-Weiss, produzindo OH^{\cdot} , considerado o radical mais reativo e danoso para as macromoléculas (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). Portanto, a coordenação adequada da atividade da SOD, CAT e peroxidases é fundamental para manter sob controle a produção do radical OH^{\cdot} .

Em condições normais de sobrevivência, a atuação das enzimas antioxidantes leva a redução das EROs nas células, entretanto, em casos de elevada produção desses radicais livres, haverá estresse oxidativo, caracterizado por oxidação de biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Poderá também desencadear o processo de morte celular pela oxidação e inativação dos componentes celulares (MITLLER, 2002).

O incremento da produção de EROs tem sido amplamente demonstrado como resultado da exposição das plantas a vários tipos de estresses abióticos (MITTLER, 2002), inclusive o anaeróbico (DEUNER et al., 2009; ZANANDREA et al., 2009). Segundo Hernandez et al. (2010), plantas com maior atividade do sistema antioxidante são mais resistentes aos danos oxidativos. Isso foi verificado por Zanandrea (2009), em seu estudo com *Sesbania virgata* e *Polygonum acuminatum*, espécies tolerantes ao alagamento, que constatou o aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante ao longo do estresse.

A elevação da atividade da SOD em resposta à manutenção do estresse em plântulas C1 e C18 indica maior capacidade de neutralização dos radicais superóxido, proporcionando maior tolerância à hipoxia. A atuação da SOD gera H_2O_2 , produto tóxico à célula, necessitando, então, da ação de APX e CAT,

enzimas que detoxificam este composto, formando produtos não tóxicos à célula. Nesse caso, os dados revelam que no milho Saracura, a exemplo do que foi demonstrado por Foyer e Noctor (2005), o metabolismo antioxidante atua com eficiência, de modo que as enzimas que dele participam trabalham em harmonia, ou seja, uma enzima subsequente (APX e CAT) remove o produto formado (H_2O_2) pela anterior (SOD).

Comparando as taxas de atividades da APX e CAT verifica-se que a APX é mais eficiente na remoção do H_2O_2 confirmando que ela tem maior afinidade pelo substrato que a CAT. Alternativamente, a APX em relação à CAT está mais amplamente distribuída na célula o que leva a aumentos na sua eficiência pelo maior número de moléculas (WILLEKENS et al., 1995). Nesta mesma linha de raciocínio, Lopes (2005) verificou maior atividade da APX em plantas de milho Saracura do ciclo 16 quando comparada com a atividade nas raízes da variedade sensível ao encharcamento BR107.

Comparando-se as atividades das enzimas antioxidantes nas raízes de plântulas C1 e C18, verifica-se que estas últimas apresentaram maior eficiência na remoção de EROs, até as 144 h de encharcamento. A partir daí, houve uma redução da atividade de SOD e CAT (Gráfico 7), que aliada à continuidade do estresse por mais 24h, possivelmente, tenha levado a um acúmulo de radicais livres, favorecendo a peroxidação lipídica (DREW, 1997), a degradação de membranas e a formação de aerênquimas. Em seus estudos com raízes de milho Saracura, Pereira et al. (2010) constataram redução da atividade da CAT e aumento da atividade da APX em raízes ao longo dos ciclos de seleção. Esses autores relacionaram a maior formação de aerênquimas em milho Saracura do ciclo 18 à redução da atividade da CAT ao longo dos ciclos de seleção. Segundo Cakmak e Horst (1991), a redução na atividade da CAT indica que, em plantas mantidas sob condições de estresse, o H_2O_2 gerado é mais consumido em

processos oxidativos, como na peroxidação de lipídios, do que eliminado do metabolismo.

A formação de aerênquima pode ocorrer por ação de radicais livres formados pelo estresse anóxico. A morte celular programada, também chamada de apoptose, é um processo diretamente relacionado com a sinalização conferida pelo aumento descontrolado nas espécies reativas de oxigênio (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Pode também ser desencadeado pela rota do etileno, que ativa as enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular, como a celulase (DREW, 1997; IRFAN et al., 2010). Assim, de posse dos conhecimentos acerca do comportamento enzimático do sistema antioxidante das raízes de milho Saracura há que se considerar ainda, a atividade das enzimas de degradação e afrouxamento de parede celular na formação dos aerênquimas.

Até 48 horas a atividade da celulase em plântulas C1 sob encharcamento, a exceção de 6 h que foi menor, não diferiu do controle (Gráfico 9a). A partir daí, apresentou-se maior em todas as avaliações. Por outro lado, a atividade da poligalacturonase (PG) se apresentou maior que a do controle em todo o período de encharcamento (Gráfico 9b).

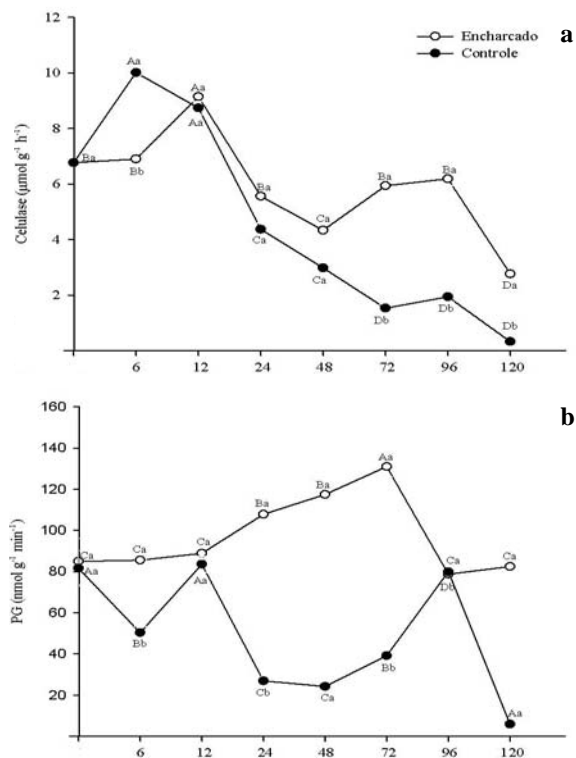


Gráfico 9 Atividade da celulase (a) e PG (b) em raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 1 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em plântulas C18 a atividade da celulase aumentou nas primeiras seis horas de encharcamento após o que, caiu quase que linearmente até o final das avaliações (Gráfico 10a). Em relação ao controle, a atividade dessa enzima, a exceção da última avaliação, sempre foi maior nas plântulas sob estresse de oxigênio. Quanto à PG, sua atividade não demonstrou um padrão uniforme, iniciando-se em níveis basais, com picos de atividade às 24, 72 e 96 h, e redução sucessiva até a última avaliação (Gráfico 10b).

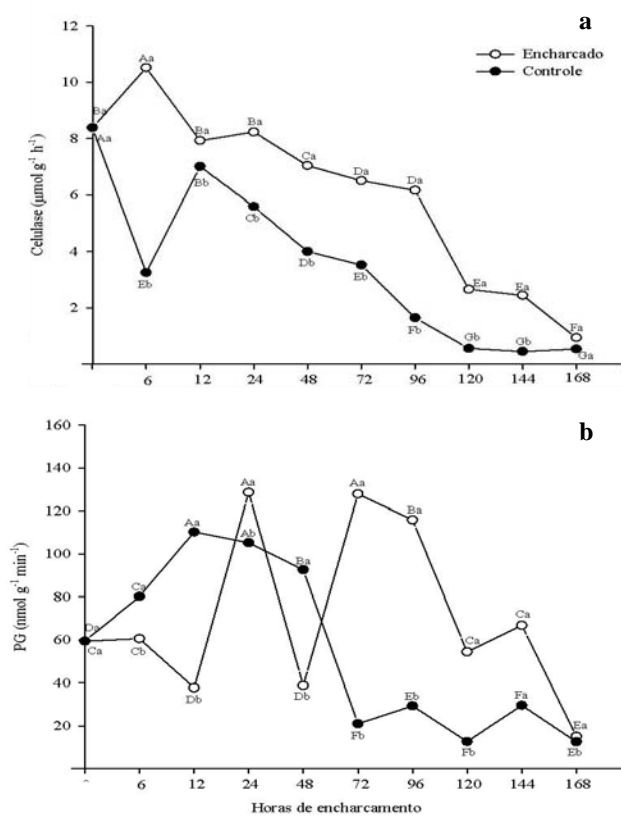


Gráfico 10 Atividade da celulase (a) e PG (b) em raízes de plântulas de milho Saracura do ciclo 18 sob encharcamento do substrato. As letras maiúsculas comparam as médias dentro dos tratamentos, enquanto as letras minúsculas comparam entre os tratamentos, com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A celulase é uma enzima relacionada diretamente à lise da parede celular, enquanto a PG está ligada somente ao afrouxamento da parede celular. De acordo com He, Drew e Morgan (1994, 1996), a celulase é uma enzima produzida por células corticais que sofrem ação do etileno, entrando em

processo de morte celular. Os mesmos autores sustentam a hipótese de que outras enzimas relacionadas ao metabolismo de parede celular sejam também ativadas pelo etileno. Ainda assim, há maior associação de PG com formação de aerênquimas esquizógenos, enquanto a celulase relaciona-se aos aerênquimas lisígenos.

A formação de aerênquimas, segundo Bragina, Rodionova e Grnieva (2003), depende da atuação das enzimas de afrouxamento e daquelas de degradação da parede celular. Devido à conformação da parede, primeiramente deve haver a ação de uma pectinase (PG), que permitirá o acesso da enzima de degradação (celulase) ao conteúdo da parede celular, levando à lise da célula. Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com o desses autores, já que para plântulas C1 e C18 constatou-se elevadas atividades de ambas as enzimas de metabolismo de parede celular.

De acordo com Pereira et al. (2008) e Souza et al. (2009), os aerênquimas formados em raízes de milho Saracura são lisígenos. Lenochová, Soukup e Votrubová (2009) verificaram que a aplicação de AOA (ácido aminoxiacético), inibidor da síntese de etileno, reduziu a proporção de aerênquimas, assim como influenciou negativamente o crescimento de raízes e parte aérea das plântulas. Há, portanto, uma relação direta entre a presença do etileno e a indução da atividade das enzimas de degradação de parede celular (HE; DREW; MORGAN, 1996).

Em geral, no que se refere às enzimas de degradação de parede celular, plântulas C1 e C18 apresentaram atividade da celulase superior à da poligalacturonase. Contudo, o perfil dessas enzimas se diferiu entre os dois ciclos de seleção, de modo que no ciclo 1, houve resposta com maior atividade da PG às 6 horas de tratamento, enquanto que a resposta no ciclo 18 neste mesmo período, foi atividade elevada da celulase. Tal fato pode influenciar no tempo e na amplitude da ocorrência dos aerênquimas nos dois ciclos de seleção.

Em relação à formação de aerênquimas, a proporção da área ocupada pelos mesmos em relação à do córtex variou entre raízes plântulas dos ciclos 1 e 18 (Tabela 1).

Tabela 1 Proporção da área de aerênquimas em relação à área do córtex (%) em raízes de milho Saracura dos ciclos 1 e 18 submetidas ao encharcamento do solo.

Encharcamento	Proporção de aerênquimas (%)	
	C1	C18
0 h	0,99 d	4,74 f
6 h	2,34 d	10,05 e
12 h	4,51 d	15,13 e
24 h	8,60 c	18,09 d
48 h	19,10 b	27,85 c
72 h	19,28 b	36,88 b
96 h	28,54 a	40,37 b
120 h	27,09 a	46,20 a
144 h	-	42,24 b
168 h	-	51,65 a

As médias das colunas diferem entre si com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Em plântulas C1 não houve diferença significativa na proporção de aerênquimas até às 12 h de estresse. A partir daí, houve um aumento de modo que, as 120h de estresse anaeróbico, a área de aerênquima era cerca de 27 vezes maior que àquela observa inicialmente (Figura 1).

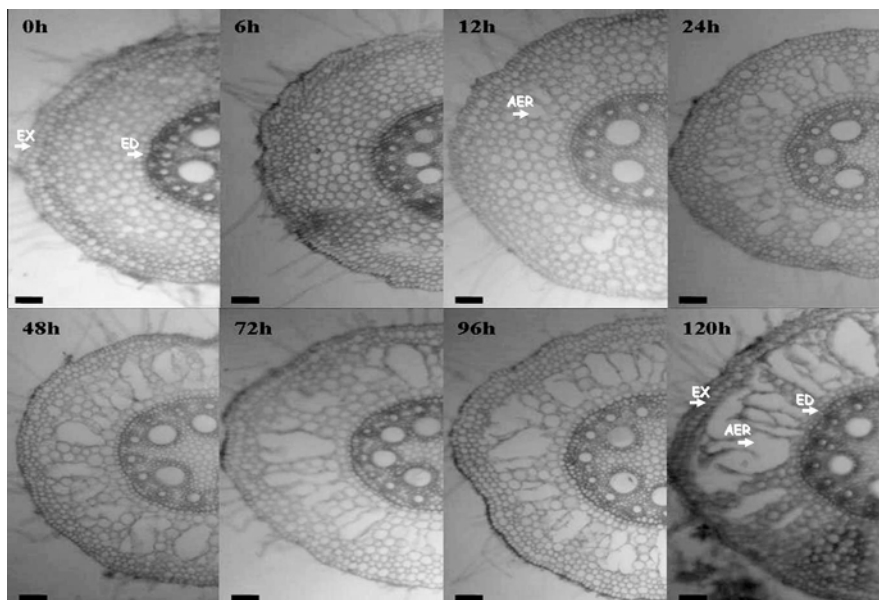


Figura 1 Secções transversais de raízes do milho Saracura do ciclo 1 com diferentes tempos de encharcamento, demonstrando a progressão na formação de aerênquimas (AER) e espessamento da endoderme (END) e da exoderme (EX). A barra corresponde a 100 μm .

Por outro lado, nas plântulas C18, suas raízes tiveram a porosidade aumentada já as 6 h do início do tratamento, aumentando progressivamente a proporção de aerênquimas com a continuidade do estresse anaeróbico. Na última avaliação, realizada às 168 horas, a área do córtex ocupada pelos aerênquimas, aumentou 11 vezes (Figura 2).

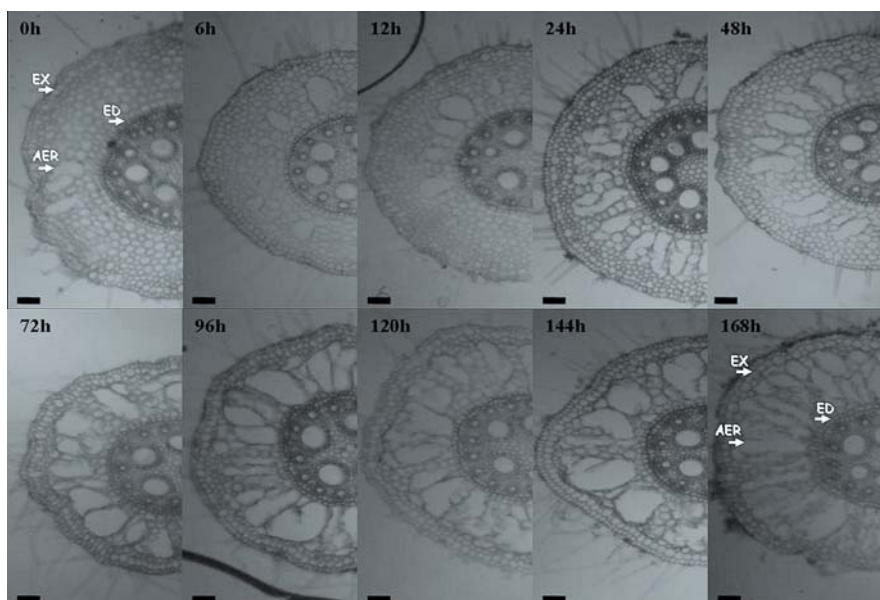


Figura 2 Secções transversais de raízes do milho Saracura do ciclo 18 com diferentes tempos de encharcamento, demonstrando a progressão na formação de aerênquimas (AER) e espessamento da endoderme (END) e da exoderme (EX). A barra corresponde a 100 μm .

Em plântulas C18 foi encontrada, após 120h de encharcamento do substrato, uma proporção de aerênquimas de 46,5% em relação ao córtex, enquanto em plântulas C1 a proporção foi de 27,09% neste mesmo período. Verificou-se também a ocorrência de aerênquimas constitutivos no córtex radicular de plântulas C18 que foi de 4,74%, comparativamente ao valor de 0,99% das plântulas C1. Tal fato pode estar relacionado com a maior tolerância deste milho ao encharcamento do solo, já que plantas com aerênquimas quando não alagadas são mais resistentes a esse tipo de estresse (MANO et al., 2006).

As raízes de plântulas C1, comparadas às C18, apresentaram menor proporção de aerênquimas em relação ao córtex, embora tenham ocorrido em ambas maior atividade da APX quando comparada às outras enzimas

antioxidantes. Aliado a isso, a atividade da celulase nos tratamentos alagados foi superior à do controle somente a partir de 72 h de estresse, enquanto elevadas atividades foram observadas para a poligalacturonase, que já às 6 horas de estresse foi superior ao controle. Houve aumento da atividade da PG ao longo dos tempos de submissão ao encharcamento do substrato.

A proporção de aerênquimas no ciclo 18 foi relativamente elevada, sendo que seu aumento se deu logo às 6 horas de alagamento, quando também a atividade da celulase nas raízes encharcadas foi superior à daquelas do controle. Neste mesmo tempo, já havia respostas do sistema antioxidante com aumento da atividade de SOD, APX e CAT. A relação entre elevadas atividades de celulase de raízes alagadas comparadas às do controle e o aparecimento de aerênquimas se manteve durante todo o período de estresse, com aumento progressivo na proporção de aerênquimas no córtex. Por outro lado, a redução na atividade da celulase a partir das 120 horas de hipoxia ocorreu quando os aerênquimas já constituíam 46,2% do córtex da raiz, havendo, portanto, menor porção de parede celular a ser degradada por esta enzima.

Os resultados deste estudo corroboram com os de Dantas, Aragão e Alves (2001), em que até 3 dias de estresse anaeróbico a proporção de aerênquimas no córtex era de 35% em raízes de plantas dos primeiros ciclos de seleção do milho Saracura. Entretanto, a atividade máxima de celulase encontrada por esses autores foi às 48 h de alagamento, não havendo, portanto, uma correlação entre atividade das enzimas de parede e o aparecimento de aerênquimas. Lopes (2005) constatou aumento na formação de aerênquima lisígeno no córtex do sistema radicular de milho Saracura nas primeiras 48 horas de encharcamento. Também Gunawardena (2008) descreveu que a formação de aerênquimas em raízes de milho se dá logo nas primeiras 12 horas de submissão ao estresse anaeróbico.

Pereira et al. (2008) e Souza et al. (2009), em estudos com diferentes ciclos de seleção do milho Saracura, verificaram variações entre as características anatômicas dos mesmos. Os autores ressaltaram a crescente capacidade de formação de aerênquimas e aumento na sua proporção ao longo dos ciclos de seleção. Tais características indicam que grande parte da área do córtex foi disponibilizada para a formação de câmaras de armazenamento de oxigênio. Esta estratégia de maior acúmulo de gases nas raízes permite maior adaptação das plantas ao ambiente hipóxico, já que garante maior oxigenação dos tecidos da raiz. A maior formação de aerênquimas lisígenos ao longo dos ciclos de seleção pode estar relacionada também à redução da atividade da poligalacturonase e aumento da celulase nos últimos ciclos de seleção, conforme resultados obtidos neste estudo. Ainda assim, este estudo demonstra que, embora em menor quantidade, os aerênquimas de origem esquizógena também contribuem para a porosidade radicular do milho Saracura.

Outra característica anatômica marcante neste estudo é o espessamento da exoderme e endoderme nas raízes. A tabela 2 apresenta os resultados referentes à variação na espessura da endoderme e na exoderme em raízes de ambos os ciclos de seleção.

Tabela 2 Espessura da endoderme e exoderme em raízes de milho Saracura dos ciclos 1 e 18 submetidas ao encharcamento do solo.

Encharcamento	Espessura da endoderme e exoderme (μm)			
	Endoderme		Exoderme	
	C1	C18	C1	C18
0h	28,18 b	21,99 d	36,41 f	35,96 d
6h	26,63 b	23,26 d	41,12 e	39,44 d
12h	27,10 b	24,17 c	42,10 e	42,37 d
24h	27,97 b	25,53 c	46,48 d	50,10 c
48h	30,95 a	27,55 b	47,49 d	49,61 c
72h	31,10 a	27,18 b	52,52 c	55,18 b
96h	31,33 a	28,04 b	55,91 b	56,94 b
120h	30,47 a	29,77 a	59,18 a	68,66 a
144h	-	30,92 a	-	70,59 a
168h	-	30,99 a	-	67,33 a

As médias das colunas diferem entre si com base no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Ao contrário dos resultados encontrados por Pereira et al. (2008) e Souza et al. (2009), houve um espessamento da endoderme e da exoderme. Visser et al. (2000) estudando raízes adventícias de monocotiledôneas de regiões alagadas, verificaram elevada porosidade radicular, além maior espessura da endoderme e exoderme. A deposição de substâncias como suberina e/ou lignina nas células da endoderme e exoderme possuem realmente uma função de barreira. A barreira pode ser tanto para a prevenção contra a perda radial de oxigênio (VISSER et al., 2000) ou etileno, mantendo a difusão de gases no interior das raízes, além de continuar o processo de formação de aerênquimas (EVANS, 2004). Há também a função de sustentação radicular para a formação de raízes laterais no período de estresse, principalmente quando se trata de plantas jovens (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A ocorrência de aerênquimas reduz a demanda de oxigênio, já que permite que o gás presente nas câmaras aeríferas se difunda mais facilmente no córtex. Aerênquimas aliados ao espessamento da endoderme e exoderme

constituem uma forma de maior adaptação ao estresse anaeróbico, uma vez que além de melhorar a difusão gasosa, evita a perda radial de oxigênio pelas raízes. Tal fato pode ser comprovado por uma redução da atividade da ADH em plântulas C18 a partir de 96 h de tratamento quando os aerênquimas ocupavam 40,37% do córtex radicular. Nos tempos seguintes, até o final das avaliações, o aumento na proporção de aerênquimas no córtex foi acompanhado da redução na atividade da ADH, demonstrando a redução na taxa de anaerobiose. Outro fato comprobatório é o aumento do crescimento, em matéria seca, das raízes de plântulas C18 nas três últimas épocas de coleta.

Segundo Irfan et al. (2010), a duração do alagamento, bem como os fatores genotípicos são decisivos para a resistência da planta ao estresse. Estudos prévios com diferentes ciclos de seleção do milho Saracura (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; FRIES et al., 2007; PEREIRA et al., 2008, 2010; SOUZA et al., 2009; VITORINO et al., 2001) demonstraram maior tolerância do mesmo diante de condições de baixa disponibilidade de oxigênio. O presente estudo corrobora com os anteriores, principalmente no que concerne à presença de atributos bioquímicos e fisiológicos que, por processo de seleção, estão presentes no ciclo 18 e que podem ser responsáveis pela maior tolerância do mesmo ao estresse anaeróbico.

A rápida resposta do sistema antioxidante à anaerobiose, elevada atividade de celulase logo nas primeiras horas de alagamento e ampla formação de aerênquimas no córtex são características bioquímicas e morfológicas que permitem maior tolerância do ciclo 18 ao encharcamento do solo. O comportamento bioquímico, anatômico e fisiológico das plântulas de milho Saracura sob encharcamento das raízes demonstra que o processo de seleção foi eficiente e permite a correlação entre produção de EROs e a formação de aerênquimas, provavelmente mediadas pelo etileno.

5 CONCLUSÃO

As plântulas do ciclo 18 do milho Saracura apresentam características bioquímicas e morfofisiológicas que lhe conferem maior tolerância ao estresse anaeróbico. Embora em ambos os ciclos de seleção tenham ocorrido modificações no sistema enzimático e a formação de aerênquimas no córtex, as respostas apresentadas pelas plântulas do ciclo 18 foram mais intensas que do ciclo 1, por isso a maior taxa de sobrevivência após serem submetidas à hipoxia.

Alterações no sistema enzimático e a formação de extensas áreas de aerênquimas no córtex, aliados ao espessamento da endoderme e exoderme, permitiram que as plântulas tolerassem por 168 horas de estresse, mantendo alta taxa de sobrevivência após serem submetidas à hipoxia.

Existe uma estreita relação entre o sistema antioxidante, atuação de enzimas de parede celular e a formação dos aerênquimas em raízes de milho Saracura. O processo de seleção levou à existência de uma variedade com atributos favoráveis à sua sobrevivência em casos de estresse por hipoxia.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627 p.

ALMEIDA, A. M.; VRIEZEN, W. H.; STRAETEN, D. Molecular and physiological mechanisms of flooding avoidance and tolerance in rice. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 50, n. 6, p. 832-840, Nov. 2003.

ALVES, J. D. et al. Mecanismos de tolerância da variedade de milho “Saracura” (BRS 4154) ao encharcamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 33-40, jan. 2002.

ANDREWS, D. L. et al. Hypoxic and anoxic induction of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 2, p. 407-414, Feb. 1993.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, June 1999.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: KYLE, J.; OSMOND, C. B.; ARNTZEN, K. (Ed.). **Photoinhibition**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 227-287.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 313-339, June 2008.

BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 5, p. 359-373, May 2010.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 1, p. 179-194, Jan. 2003.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. van; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, Nov. 1992.

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

BRAGINA, T. V.; RODIONOVA, G. M.; GRINIEVA, G. M. Ethylene production and activation of hydrolytic enzymes during acclimation of maize seedlings to partial flooding. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 50, n. 6, p. 794-798, Nov. 2003.

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, n. 1, p. 264-266, Jan./Feb. 1978.

CAKMAK, I.; HORST, W. T. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 83, n. 3, p. 463-468, July 1991.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 17-36, Jan. 2003.

COLMER, T. D.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, n. 8, p. 665-681, July 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grão: décimo levantamento**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

DANTAS, B. F.; ARAGÃO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, abr./jun. 2001.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 1-15, Jan. 2000.

DEUNER, S. et al. Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. **Cerne**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 135-140, jul./dez. 2008.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo. **Características agronômicas das cultivares de milho disponíveis no mercado na safra 2009/10**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/TABELA1.html>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

EVANS, D. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 1, p. 35-49, Jan. 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Coarse grains production in 2009 to rise above last year's peak**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 jul. 2010.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, July 2005.

FRIES, D. D. **Efeito do cálcio em enzimas do sistema antioxidante em plântulas do milho (*Zea mays* L.) 'Saracura' - BRS-4154 submetidas à baixa disponibilidade de oxigênio**. 2006. 47 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FRIES, D. D. et al. Crescimento de plântulas do milho 'Saracura' e atividade de α -amilase e invertases associados ao aumento da tolerância ao alagamento exercido pelo cálcio exógeno. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 1, p. 1-9, jan./mar. 2007.

FRUGOLI, J. A. et al. Catalase 1s encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 11, n. 2, p. 327-336, May 1996.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GOMES-JUNIOR, R. A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 11, p. 1330-1337, Nov. 2006.

GUNAWARDENA, A. et al. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 212, n. 2, p. 205-214, Apr. 2001.

GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. Programmed cell death and tissue remodelling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 445-451, Feb. 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford University, 1989. 543 p.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HE, C. J.; DREW, M. C.; MORGAN, P. W. Induction of enzymes associated with lysigenous aerenchyma formation in roots of *Zea mays* during hypoxia or nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 11, p. 861-865, Nov. 1994.

_____. Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 2, p. 463-472, Oct. 1996.

HE, C. J. et al. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, n. 4, p. 1679-1685, Dec. 1996.

HERNANDEZ, M. et al. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 521-535, Jan. 2010.

INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONVENTION. **IPCC meeting on sea level rise and ice sheet instabilities**. Kuala Lumpur, 2010. Disponível em:
<http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_supporting_material.htm/>. Acesso em: 25 jul. 2010.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Wien, v. 241, n. 1/4, p. 3-17, May 2010.

JACKSON, M. B.; COLMER, T. D. Response and adaptation by plants to flooding stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 501-505, Sept. 2005.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KOZLOWSKI, T. T. Plant responses to flooding of soil. **BioScience**, Washington, v. 34, n. 3, p. 162-167, Jan. 1984.

_____. Responses of woody plants to flooding and salinity. **Tree Physiology Monograph**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-29, June 1997.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: UFRRJ, 1997. 127 p.

KUMUTHA, D. et al. Effect of waterlogging on carbohydrate metabolism in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): upregulation of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase. **Plant Science**, London, v. 175, n. 5, p. 706-716, Nov. 2008.

LENOCHOVÁ, Z.; SOUKUP, A.; VOTRUBOVÁ, O. Aerenchyma formation in maize roots. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 53, n. 2, p. 263-270, June 2009.

LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. **Proceedings of the National Science Council**, Beijing, v. 25, n. 2, p. 148-157, Apr. 2001.

LIZASO, J. I.; MELENDEZ, L. M.; RAMIREZ, R. Early flooding of two cultivars of tropical maize: I., shoot and root growth. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, n. 7, p. 979-995, July 2001.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho 'Saracura BRS-4154' sob encharcamento contínuo**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

LYONS, J. M. Chilling injuries in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 445-466, June 1973.

MANO, F. et al. Variation for root aerenchyma formation in flooded and non-flooded maize and teosinte seedlings. **Plant and Soil**, Crawley, v. 281, n. 3, p. 269-279, Mar. 2006.

MARKOVIC, O.; HEINRICHOVÁ, K.; LENKEY, B. Pectolytic enzymes from banana. **Collection Czechoslovak Chemistry Community**, London, v. 40, p. 769-774, 1975.

MIKA, A.; BUCK, F.; LÜTHJEA, S. Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots. **Journal of Proteomics**, London, v. 71, n. 4, p. 412-424, Oct. 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 1, p. 459-481, June 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-380, May 1944.

PARENTONI, S. N. et al. Seleção para tolerância ao encharcamento na variedade de milho CMS54-Saracura. In: REUNION LATINOAMERICANA, 4.; REUNION DELA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EM MAIZE, 17., 1997, Cerete y Cartagena de Ludias. **Memórias...** Cartagena de Ludias: CORPOICA/CIMMYT, 1997. p. 368-373.

PEREIRA, F. J. et al. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 450-456, maio 2010.

_____. Evolução da anatomia radicular do milho "Saracura" em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, dez. 2008.

RODIONOVA, N. A. et al. Formation of extracellular enzyme systems during *Geotrichum candidum* 3C growing on the cell walls isolated from the testa of cereal grains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 37, n. 5, p. 562-565, Sept. 2001.

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.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SOUZA, T. C. et al. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, Praga, v. 55, n. 11, p. 504-510, Nov. 2009.

STOHR, C.; STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 463-470, Feb. 2006.

SUBBAIAH, C. C.; SACHS, M. M. Review article: molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 2, p. 119-127, Jan. 2003. Supplement.

SUMMER, J. E.; RATCLIFFE, R. G.; JACKSON, M. B. Anoxia tolerance in the aquatic monocot potamogeton pectinatus: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 349, p. 1413-1422, Aug. 2000.

VARTAPETIAN, B. B. Plant anaerobic stress as a novel trend in ecological physiology, biochemistry, and molecular biology: 2., further development of the problem. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, n. 6, p. 711-738, Sept. 2006.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, p. 3-20, Jan. 1997. Supplement A.

VILAS-BOAS, E. V. de B. **Modificações pós-colheita de bananas 'Prata' (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* Grupo AAB) g-irradiada.** 1995. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

VISSER, E. J. W. et al. Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mono- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1237-1245, Nov. 2000.

VITORINO, P. F. P. G. et al. Flooding tolerance and cell wall alterations in maize mesocotyl during hypoxia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1027-1035, ago. 2001.

VODNIK, D. et al. Respiratory potential of maize (*Zea mays* L.) roots exposed to hypoxia. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 107-110, Jan. 2009.

VOESENEK, L. A. C. J. et al. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant Dicot *Rumex palustris*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 205-211, Jan. 2003.

WALKER, D. et al. High endo- β -1,4-D-glucanase activity in a broad pH range from the alkali-tolerant *Nocardopsis* sp. SES28. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 22, n. 7, p. 761-764, July 2006.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 207-228, Sept. 1995.

XIONG, H.; LI, Y.; LI, L. A unique form of cell death occurring in meristematic root tips of completely submerged maize seedlings. **Plant Science**, Clare, v. 171, n. 5, p. 624-631, Nov. 2006.

YAMANOSHITA, T. et al. Effects of flooding on downstream processes of glycolysis and fermentation in roots of *Melaleuca cajuputi* seedlings. **Journal of Forest Research**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 199-204, June 2005.

ZANANDREA, I. **Crescimento, anatomia, metabolismo anaeróbico e sistema de defesa antioxidante de plantas em condição de alagamento**. 2009. 73 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, n. 12, p. 661-669, Dec. 2009.