



MARINÊS FERREIRA PIRES

**FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES
DE MILHO SARACURA BRS 4154
SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO**

LAVRAS – MG

2015

MARINÊS FERREIRA PIRES

**FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE MILHO SARACURA
BRS 4154 SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pires, Marinês Ferreira.

Formação do aerênquima em raízes de milho Saracura BRS
4154 submetidas ao alagamento / Marinês Ferreira Pires. – Lavras :
UFLA, 2015.

95 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Anatomia radicular. 2. Hipoxia. 3. Etileno. 4. Peróxido de
hidrogênio. 5. Enzimas de degradação de parede celular. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARINÊS FERREIRA PIRES

**FORMAÇÃO DO AERÊNQUIMA EM RAÍZES DE MILHO SARACURA
BRS 4154 SUBMETIDAS AO ALAGAMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2015.

Dr. Paulo César Magalhães

EMBRAPA

Dra. Aristéa Alves Azevedo

UFV

Dra. Rosy Mary dos Santos Isaias

UFMG

Dr. Cleberson Ribeiro

UFV

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Orientador

LAVRAS – MG

2015

*À minha amada família, meu porto seguro, e ao Jean, companheiro de cada
momento ...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria, determinação, discernimento e paciência para chegar até aqui.

Aos meus pais, João e Mariana, pelos exemplos de como seguir sempre em frente e pelo apoio incondicional às minhas escolhas.

À Josiane, minha irmã, por sempre estar ao meu lado.

Ao Jean, meu amigo, amor, companheiro, por dividir cada momento feliz, cada conquista, cada desafio e cada sonho.

Ao meu orientador, Prof. Evaristo Mauro de Castro, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos e oportunidades e pela confiança em mim depositada.

Aos membros da banca, por gentilmente aceitarem o convite para participação na defesa.

Ao Prof. Fabrício José Pereira e ao Dr. Sílvio Junio Ramos pelo auxílio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada por todos os ensinamentos ao longo do curso.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, na pessoa de Dr. Paulo César Magalhães por gentilmente ter cedido as sementes de milho Saracura para a condução do experimento.

Ao Prof. Eduardo V. de B. Vilas Boas pela disponibilidade e apoio para as análises de determinação do etileno, no Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças, do Departamento de Ciências dos Alimentos.

À Profa. Heloisa Oliveira dos Santos pelo apoio nas análises de expressão gênica, no Laboratório de Análises de Sementes, do Departamento de Agricultura.

Ao Prof. Valdemar Faquin pelo apoio na montagem do experimento e disponibilização da casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo.

Ao Prof. José Donizete Alves pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas para as análises bioquímicas.

À Isabel C. S. Neta por todo auxílio na condução das análises de expressão gênica.

À Isabel Brandão e Kamila por todo auxílio na condução das análises bioquímicas.

À Aline Monteiro pelo auxílio na condução das análises de determinação do etileno.

Ao Cleber Rodas pelo auxílio na montagem do experimento.

Aos técnicos de laboratório, Dartagnan, Gisele, Antônio, Elenir e, em especial, ao Ítalo por todo auxílio na condução das análises.

À Eliana por todo carinho e atenção.

Aos funcionários do Departamento de Biologia por toda solicitude.

Aos alunos de iniciação científica, fundamentais à execução deste trabalho, Tuani, Osmar, Luana, Fernanda, Marcela e Eduarda.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Márcio, Luciana, Luiz, Katiúcia, Flávio, Afonso, Juliana, Ana Carolina e Felipe pelo companheirismo.

Aos demais botânicos do meu coração que fizeram parte desta caminhada, em especial à Raquel, Nayara, Suelen, Katiúscia, João e Jaiane.

Às minhas amigas Thais, Suelen e Flávia por estarem sempre presentes, mesmo que geograficamente distantes.

À UFLA e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada pela oportunidade de realização do curso e condução dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram parte desta etapa tão importante em minha vida. Muito obrigada!!!

*“As pessoas mais felizes não
têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.”*

Clarice Lispector

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê...”

Marcelo Camelo

RESUMO

A cultivar de milho 'Saracura' BRS-4154 foi desenvolvida pela Embrapa Milho e Sorgo para tolerar períodos intermitentes de alagamento. Assim, objetivou-se neste trabalho analisar o papel do etileno e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na formação do aerênquima em diferentes ciclos de seleção genética de 'Saracura' em quatro tempos de alagamento. Para isso, plantas dos ciclos C1, C5, C11 e C18 e da variedade sensível BR 107 foram alagadas por sete dias, com coleta das raízes em: 0 (sem alagamento), 1, 3, 5 e 7 dias. Foi analisada a expressão gênica das enzimas ACC sintase (ACS), ACC oxidase (ACO), dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX); a produção de etileno e o conteúdo de H_2O_2 ; a atividade das enzimas ACO, celulase e poligalacturonase (PG); e a anatomia radicular. Não houve expressão de ACS e ACO. Mas houve variação da atividade de ACO e da produção de etileno. A expressão de SOD foi maior em C1 e a de APX em C18, com redução aos sete dias. O conteúdo de H_2O_2 não diferiu. A atividade da celulase foi maior em C1 e C18, aos sete dias; a da PG foi pouco modificada. A proporção de aerênquima variou entre os ciclos, em função da taxa de formação, aumentando ao longo do tempo. A área do córtex e a espessura da endoderme aumentaram ao longo do tempo e nos ciclos finais; a exoderme reduziu nas plantas sob maior tempo de alagamento; e a epiderme não variou. Houve formação de espaços intercelulares no meristema fundamental e modificação na diferenciação da endoderme no ápice radicular. O tempo de alagamento e o ciclo de seleção genética influenciam os mecanismos de formação do aerênquima. O etileno e o H_2O_2 podem estar relacionados à indução desse tecido.

Palavras-chave: Anatomia radicular. Hipoxia. Etileno. Peróxido de hidrogênio. Enzimas de degradação de parede celular.

ABSTRACT

The maize cultivar 'Saracura' BRS-4154 was developed by the National Maize and Sorghum Research Center. Thus, the work was carried out with the purpose of analyzing the role of ethylene and hydrogen peroxide (H_2O_2) in the aerenchyma formation to different genetic selection cycles of 'Saracura' on four flooding times. For thus, plants of cycles C1, C5, C11 and C18, and sensitive variety BR 107 were flooded for 7 days with roots collected to 0 (control (no flooding)), 1, 3, 5 and 7 days. The gene expression of the enzymes ACC synthase (ACS), ACC oxidase (ACO), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX); the determination of ethylene production and H_2O_2 ; the enzymatic activity of ACO, cellulase and polygalacturonase (PG); and the root anatomy were performed. There wasn't expression to ACS and ACO. ACO activity and ethylene production were increased while SOD expression was higher at C1 and APX was higher at C18, with reduction in the last day. H_2O_2 content was similar between treatments. The cellulase activity was higher at C1 and C18 and it increased with time; the PG activity was slightly modified. The proportion of aerenchyma varied between cycles, depending on the formation rate and it increased during flooding. The total area of the cortex and the endoderm thickness increased with time and in the final cycles. The exoderm reduced in plants under long flooding; there was no variation of the epidermis. It was observed intercellular spaces formation in the meristem and change in the differentiation of endoderm in the root apex. The flooding time and genetic selection cycle influenced the aerenchyma formation mechanisms. The ethylene and H_2O_2 may be related to induction of tissue.

Keywords: Root anatomy. Hypoxia. Ethylene. Hydrogen peroxide. Cell wall degrading enzymes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Alagamento do solo	16
2.2	Tolerância das plantas ao alagamento	18
2.3	Aerênquima	19
2.3.1	Aerênquima lisígeno induzido por hipoxia	22
2.3.1.1	O Etileno	26
2.3.1.2	As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	29
2.3.1.3	A Morte Celular Programada	33
2.3.1.4	A Degradação da Parede Celular	35
2.4	Milho Saracura	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Material vegetal	38
3.2	Condições de crescimento	38
3.3	Imposição dos tratamentos	38
3.4	Análise da expressão das enzimas ACC sintase, ACC oxidase, dismutase do superóxido e peroxidase do ascorbato por meio de técnicas de qRT-PCR	39
3.5	Atividade enzimática da ACC oxidase (ACO) (EC 1.14.17.4)	43
3.6	Determinação da produção de etileno	44
3.7	Determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	44
3.8	Atividade enzimática da celulase (EC 3.2.1.4)	45

3.9	Atividade enzimática da poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15)	45
3.10	Análises anatômicas da raiz	47
3.11	Análises estatísticas	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade hídrica é um dos fatores ambientais mais estudados em relação ao crescimento e sobrevivência das plantas, sendo muito afetada pelas mudanças climáticas (ASHARAF, 2010; SOUZA et al., 2013).

Nesse sentido, inundações ou alagamentos caracterizam estresses abióticos com impactos significativos na sobrevivência das plantas em muitas regiões do mundo (SOUZA et al., 2009), chegando a afetar 10% da superfície terrestre e sendo umas das principais restrições à produção agrícola (PATEL et al., 2014). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO e o Instituto Internacional para Pesquisas Estatísticas Aplicadas, o alagamento pode reduzir seriamente a produção agrícola, considerando as estimativas de áreas cultiváveis e a produtividade mundiais. No Brasil, aproximadamente 28 milhões de hectares de terras potencialmente cultiváveis apresentam alagamento (VITORINO et al., 2001). Nessa condição ocorre redução na concentração de gases no solo, resultando em hipoxia ou anoxia (SAIRAM et al., 2008).

Plantas tolerantes ao alagamento são capazes de modular seu metabolismo, morfologia e anatomia para sobreviver e se reproduzir (FERNÁNDEZ, 2006). Uma das estratégias mais comuns é a formação de aerênquima nas raízes e parte aérea, um tecido vegetal contendo alta proporção de espaços intercelulares maiores que os comumente encontrados (DREW; HE; MORGAN, 2000; ESAU, 1977; EVANS, 2003) que facilitam a difusão de gases entre os órgãos inundados e não inundados das plantas (LENOCHOVÁ; SOUKUP; VOTRUBOVÁ, 2009). Dois tipos principais de aerênquima são reconhecidos: esquizógeno e lisígeno (EVANS, 2003; JACKSON; ARMSTRONG, 1999). Aerênquima esquizógeno é formado por meio da separação e expansão diferencial das células, sem morte celular. Por outro lado,

aerênquima lisígeno é formado pela morte celular e subsequente lise de algumas células (YAMAUCHI et al., 2013), sendo considerado uma forma de morte celular programada, a qual envolve a biossíntese de etileno (DREW; HE; MORGAN, 2000; JACKSON; ARMSTRONG, 1999). Além destes, Seago Júnior et al. (2005) descreve variações nos padrões de formação de aerênquima, incluindo outras classificações, como o expansígeno, formado pela expansão de espaços pela divisão e crescimento celular, sem mais separação das células e colapso ou morte celular.

Zea mays L., classificado como planta sensível à hipoxia, é um dos organismos modelo usado no estudo das respostas das plantas ao alagamento, especialmente pela formação de aerênquima lisígeno no córtex da raiz (LENOCHOVÁ; SOUKUP; VOTRUBOVÁ, 2009) induzido por esse estresse. Em 1986 teve início pela Embrapa Milho e Sorgo o desenvolvimento da cultivar Saracura BRS-4154 resistente a períodos intermitentes de alagamento para tornar possível a produção desta cultura nas diversas regiões onde ocorre este tipo de estresse. Essa cultivar foi melhorada para a produção e sobrevivência, sendo o desenvolvimento de aerênquima, nas raízes e na parte aérea da planta (ALVES et al., 2002), uma característica fundamental na tolerância dos sucessivos ciclos de seleção do milho ‘Saracura’ ao alagamento (PEREIRA et al., 2008, 2010; SOUZA et al., 2009, 2011). Com essa característica, a cultivar que já está disponível no mercado desde 1997, tem produtividade estimada em 5 a 6,5 t/há, além de muito bom empalhamento, sanidade das espigas, resistência ao acamamento e quebramento (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2015).

Muitos trabalhos demonstram os mecanismos de formação de aerênquima lisígeno em milho, geralmente em cultivares sensíveis ao alagamento (ABIKO et al., 2012; EVANS 2003; GEISLER-LEE; CALDWELL; GALLIE, 2010; GUNAWARDENA et al., 2001; HE; DREW; MORGAN, 1994;

HE et al., 1996; HE; MORGAN; DREW, 1996; MANO; OMORI, 2013; RAJHI et al., 2011; THIRUNAVUKKARASU et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2013), têm o envolvimento de etileno e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na sinalização de morte celular programada. Segundo estes trabalhos, a deficiência de oxigênio estimula a produção de etileno (HE et al., 1996), que regula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a morte celular (RAJHI et al., 2011; YAMAUCHI; RAJHI; NAKAZONO, 2011). Além disso, em alguns estudos a relação direta entre a formação de EROs e o surgimento de aerênquimas é sugerida (STEFFENS; STEFFEN-HEINS; SAUTER, 2013), uma vez que a produção dessas moléculas, principalmente o H_2O_2 , por complexos enzimáticos é induzida em condições de hipoxia e pode levar a morte celular (RAJHI et al., 2011; YAMAUCHI et al., 2014). Em ‘Saracura’ Pereira et al. (2010), Porto et al. (2013) e Souza (2010) constataram a geração de EROs de modo indireto, conforme a análise do comportamento de enzimas do sistema antioxidante. No entanto, a possível relação entre EROs e a formação de aerênquima, assim como o envolvimento do etileno nesse processo ainda não foram investigados em milho ‘Saracura’, uma cultivar tolerante ao alagamento intermitente, que passou por seleção genética.

Assim, considerando a importância de se compreender o processo de indução de aerênquima em milho ‘Saracura’, uma cultivar que atende a demanda de plantio em regiões de várzea no país, este trabalho foi realizado com o objetivo geral de verificar o papel do etileno e do H_2O_2 , na formação deste tecido em diferentes ciclos de seleção genética ao longo do tempo de alagamento. Para isso, os objetivos específicos incluíram analisar a expressão gênica de enzimas da via biossintética do etileno e do sistema antioxidante, a atividade enzimática da ACC oxidase, das enzimas de degradação de parede (celulase e poligalacturonase), a determinação do conteúdo de peróxido e da produção de etileno e a anatomia da raiz.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alagamento do solo

O alagamento ou encharcamento do solo pode ser resultado de várias práticas diretas, como a irrigação inadequada, ou indireta, como mudanças climáticas, além de eventos naturais (IRFAN et al., 2010). Estima-se que regiões sujeitas naturalmente à inundação compreendam dois milhões de quilômetros quadrados na América do Sul, cerca de 11% desse território (JUNK, 1993).

O excesso de água no solo promove a deficiência de oxigênio ou sua completa ausência (BAILEY-SERRES; COLMER, 2014; SAIRAM et al., 2008). Com isso, a baixa taxa de difusão, baixa solubilidade e o aumento da atividade microbiana reduzem o conteúdo de oxigênio no solo, além de adicionar compostos tóxicos, inorgânicos e orgânicos (GAMBRELL; DELAUNE; PATRICK JÚNIOR, 1991). Conseqüentemente, os principais efeitos do alagamento, como deficiência de oxigênio e o baixo potencial redox do solo, afetam vários processos fisiológicos das plantas (BAILEY-SERRES; COLMER, 2014; MEDRI et al., 2012).

A redução do oxigênio sob alagamento provoca alterações no potencial de oxirredução e no pH do solo (KÖGEL-KNABNER et al., 2010), que interferem na fertilidade do solo e nas formas estáveis dos elementos disponíveis para as plantas (SCHMIDT et al., 2013). As atividades microbianas, que durante a respiração utilizam substâncias orgânicas como fontes de carbono para a doação de elétrons, controlam as reações de oxirredução no solo (SCHMIDT et al., 2013) e sob redução ou ausência de oxigênio passam de aeróbias (condição óxica) para facultativas (condição hipóxica) ou anaeróbias (condição anóxica). Os microrganismos anaeróbios facultativos e obrigatórios usam NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , produtos da decomposição da matéria orgânica (CO_2 , N_2) e íons H^+

como eletroceptores na respiração, sendo transformados em formas reduzidas e conferindo características de redução ao solo (BARTLETT; JAMES, 1993).

Assim, com o alagamento ocorre ocupação dos espaços porosos do solo por água, depleção de O_2 e aumento de CO_2 produzidos pela respiração microbiana em regiões de anaerobiose. Além disso, o oxigênio livre é rapidamente consumido pelos micro-organismos aeróbicos existentes no solo (CAMARGO; SANTOS; ZONTA, 1999), intensificando ainda mais as condições de hipoxia ou anoxia.

Nessas condições, de acordo com Colmer e Voesenek (2009) vários problemas podem ocorrer no corpo vegetal:

(i) Crise de energia. A fosforilação oxidativa na respiração, com consumo de O_2 , é a principal fonte de ATP em células vegetais. Sob alagamento a produção de ATP ocorre na glicólise, podendo haver regeneração de NAD^+ pela conversão de piruvato em etanol. No entanto, por apresentar uma produção menor de ATP as células passam por uma crise de energia, que geram danos em componentes celulares como em membranas e acidose citosólica (GIBBS; GREENWAY, 2003).

(ii) Crise de carboidratos. Açúcares solúveis e amido são importantes na manutenção da glicólise e, conseqüentemente, na geração de ATP por meio da respiração ou fermentação. Com o alagamento, as limitações em CO_2 e radiação podem reduzir a disponibilidade de açúcares, resultando na morte de células e órgãos vegetais (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008).

(iii) Toxicidade. Sob alagamento compostos reduzidos como Mn^{2+} , Fe^{2+} e S^{2-} podem se acumular em níveis tóxicos nos tecidos radiculares (JACKSON; DREW, 1984). Além disso, em razão da baixa volatilidade, ácidos orgânicos podem se acumular em solos encharcados e raízes (ARMSTRONG; ARMSTRONG, 1999). A presença destes ácidos e a elevação na concentração

de CO₂ podem impor 'cargas ácidas' nas células radiculares em solos alagados (GREENWAY; ARMSTRONG; COLMER, 2006).

(iv) Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). O excesso de produção de EROs é um processo comum nas células de plantas sob baixa concentração de oxigênio (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003), podendo desempenhar importantes papéis no metabolismo vegetal.

(v) Déficit hídrico. O alagamento pode induzir uma diminuição na condutividade hidráulica de raízes (HOLBROOK; ZWIENIECKI, 2003), que provoca estresse hídrico na parte aérea de algumas plantas.

Estas respostas apresentadas pelas plantas ao alagamento, no entanto, dependem do nível de tolerância ou sensibilidade da espécie, do estágio de desenvolvimento das plantas, assim como da duração e intensidade da condição de estresse.

2.2 Tolerância das plantas ao alagamento

Verifica-se que as plantas terrestres tiveram origem de ancestrais aquáticos (COLMER; VOESENEK, 2009) e recuperaram a capacidade de tolerar o alagamento mais de 200 vezes ao longo do tempo evolutivo (JACKSON; ISHIZAWA; ITO, 2009), sugerindo que um restrito número de mutações pode alterar essa tolerância (VOESENEK; PIERIK, 2008). De acordo com Voesenek e Sasidharan (2013), nas plantas tolerantes distinguem-se dois mecanismos adaptativos: os que visam à melhora das trocas gasosas entre os órgãos da planta e entre a planta e o ambiente, favorecendo o estado de energia e carboidratos; e os que ajustam metabolicamente o consumo de energia e carboidratos da planta para lidar com a deficiência de O₂.

Em plantas tolerantes mecanismos anatômicos, metabólicos e morfológicos podem favorecer sua sobrevivência em condições de alagamento

(BAILEY-SERRES; COLMER, 2014; STEFFENS, 2014). Duas importantes modificações nas plantas sob alagamento envolvem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o acúmulo do hormônio etileno (STEFFENS, 2014), que juntamente com os níveis de O₂ e CO₂ funcionam como sinais para indução de processos de aclimação ao estresse, como formação de aerênquima, raízes adventícias, hipertrofia de lenticelas e hiponastia das folhas (VOESENEK; SASIDHARAN, 2013).

Além disso, pode ocorrer a formação de barreiras à perda radial de oxigênio nas raízes (COLMER, 2003; COLMER; VOESENEK, 2009) e aclimações metabólicas. Estas aclimações incluem a redução no uso de energia, por restrição na tradução de mRNAs, redução na formação de parede celular e ribossomos (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2010) e favorecimento de vias bioquímicas que utilizam pirofosfato em vez de ATP (HUANG; COLMER; MILLAR, 2008); ativação de vias que geram ATP sem fosforilação oxidativa, por meio de elevado catabolismo de sacarose, glicólise e fermentação (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2010); e indução de funções de proteção como EROs e atividade de chaperonas (MUSTROPH et al., 2010).

Considerando que o alagamento tem impactos sobre a produtividade das culturas e forrageiras (BAILEY-SERRES; COLMER, 2014), é evidente que o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao alagamento, capazes de desenvolver mecanismos de resistência ao estresse como a formação de aerênquimas, hipertrofia de lenticelas e raízes adventícias está ligado ao aumento dessa produtividade (PATEL et al., 2014).

2.3 Aerênquima

Aerênquima é um tecido que pode ser induzido em plantas sob condições de alagamento, atuando na difusão interna de oxigênio atmosférico ou

fotossintético até as raízes e permitindo a respiração aeróbica nas células radiculares (ARMSTRONG, 1979; YAMAUCHI et al., 2013). Embora geralmente associado às respostas de hipoxia, o aerênquima também pode ser causado por outras formas de estresse, como temperaturas elevadas, seca, impedância mecânica e deficiência nutricional. Além disso, forma-se de modo constitutivo na maioria das plantas de ambiente aquático ou de modo induzido em plantas de ambiente drenado em resposta às condições adversas (EVANS, 2003).

Este tecido também se distingue pelos mecanismos de formação, sendo descritos dois tipos básicos: aerênquima esquizógeno e lisígeno. Aerênquima esquizógeno é formado pelo crescimento diferencial e separação das células com a desmontagem da lamela média (EVANS, 2003; MANCUSO; SHABALA; PANG, 2010) durante o desenvolvimento do tecido, sem morte celular. Geralmente, é constitutivo, ocorrendo em muitas espécies, como as de ambiente aquático (EVANS, 2003). Por outro lado, o desenvolvimento de aerênquima lisígeno envolve a morte celular programada conforme uma série ordenada de eventos (GUNAWARDENA et al., 2001). Neste caso, formam-se estruturas onde linhas de células sobreviventes separam espaços de ar, gerados pela morte das células. As células sobreviventes conferem integridade estrutural à raiz e permitem o transporte apoplástico e simplástico de nutrientes (EVANS, 2003). O aerênquima ser constitutivo ou induzido, sendo encontrado em importantes espécies cultivadas, como cevada (ARIKADO; ADACHI, 1955), trigo (TROUGHT; DREW, 1980), milho (GUNAWARDENA et al., 2001; HE; DREW; MORGAN, 1994; HE et al., 1996; HE; MORGAN; DREW, 1996) e arroz (JUSTIN; ARMSTRONG, 1991).

Entretanto, em estudos mais recentes, Seago Júnior et al. (2005) descrevem o aerênquima em raízes de plantas que normalmente crescem em ambiente úmido como:

(i) expansígeno – formado pela expansão de espaços por meio de divisão e crescimento celular, sem mais separação das células e colapso ou morte celular; distinguindo-se nos padrões ‘favo de mel’ e radial;

(ii) esquizógeno – formado por expansão de espaços ao longo de setores radiais entre células radialmente adjacentes ou por separação de células ao longo de suas paredes comuns de modo a gerar espaços intercelulares radialmente ou obliquamente alinhados;

(iii) misto – formado pela combinação de espaços de origem esquizógena e expansígena;

(iv) esquizo-lisígeno – formado por separação das células ao longo de paredes radiais, seguida pela morte de algumas células, principalmente de células que produzem cristais;

(v) lisígeno – formado pelo colapso e morte celular, associado à separação de células, normalmente precedente ao colapso; podendo distinguir-se os padrões radial, tangencial e em pacote.

A hipoxia é um dos principais fatores responsáveis pela indução de aerênquima lisígeno. Nestas condições, a difusão de O₂ da atmosfera para o solo é bloqueada, levando ao decréscimo desse gás no solo e na planta (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). Essa deficiência de oxigênio desencadeia respostas funcionais e morfológicas que promovem a aclimatação às condições de hipoxia (JOSHI; KUMAR, 2012), como a formação de aerênquima, que fornece uma série de espaços intercelulares interconectados que facilita a difusão de gases entre as raízes alagadas e a atmosfera (ARMSTRONG, 1979; GUNAWARDENA et al., 2001).

Aliado à formação de aerênquima, plantas tolerantes ao alagamento desenvolvem barreiras à perda radial de oxigênio nas camadas externas da raiz, como epiderme e exoderme (COLMER, 2003; COLMER; VOESENEK, 2009), aprimorando o transporte de oxigênio até o ápice da raiz (ARMSTRONG, 1979;

COLMER, 2003; COLMER; VOESENEK, 2009) e prevenindo o efluxo de etileno para o ambiente (ARMSTRONG et al., 2000; EVANS, 2003).

2.3.1 Aerênquima lisígeno induzido por hipoxia

A indução de aerênquima por hipoxia é, provavelmente, o processo de formação de aerênquimas mais estudado, considerando a importância desse tecido para o crescimento e produtividade de plantas economicamente importantes, como o milho, em regiões sujeitas ao alagamento. De acordo com vários estudos, o etileno está envolvido na formação lisígena do aerênquima (DREW; HE; MORGAN, 1989, 2000; HE et al., 1996; HE; MORGAN; DREW, 1996; JACKSON; ARMSTRONG, 1999; YAMAUCHI et al., 2013).

Dessa forma, em solos alagados, a baixa concentração de oxigênio estimula a produção de etileno por meio do aumento da atividade das enzimas ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano) sintase e oxidase envolvidas na biossíntese desse hormônio vegetal (HE et al., 1996). Como resultado, a produção aumentada de etileno induz a morte celular no córtex radicular e a formação de aerênquima lisígeno (HE; MORGAN; DREW, 1996). Por essa via, o etileno regula a produção de espécies reativas de oxigênio (RAJHI et al., 2011; YAMAUCHI; RAJHI; NAKAZONO, 2011), que desencadeia a morte celular (YAMAUCHI et al., 2013).

O mecanismo de detecção da baixa concentração de oxigênio que induz o processo de formação de aerênquima ainda é pouco elucidado, no entanto, são considerados como mecanismos diretos e indiretos de detecção do status de O₂ nas células (BAILEY-SERRES et al., 2012; DAT et al., 2004). Os mecanismos indiretos incluem a percepção de status alterados de energia conforme mudanças nos níveis de ATP, ADP e/ou AMP, consumo de carboidratos, piruvato, pH citosólico, concentração de Ca⁺² citosólico ou produção localizada de EROs e

óxido nítrico (NO) (BAILEY-SERRES et al., 2012). Assim, em uma possível via, segundo He et al. (1996) e Subbaiah e Sachs (2003), o déficit de oxigênio nas células da raiz estimula a liberação de Ca^{+2} da mitocôndria para o citosol e o aumento da concentração do cálcio citosólico que atua, provavelmente, como mensageiro secundário induzindo a expressão de genes relacionados às enzimas responsáveis pela formação de aerênquima. Por outro lado, estudos mais recentes descrevem um mecanismo molecular de detecção direta de O_2 , envolvendo regulação da expressão de genes responsivos à hipoxia pela regulação pós - traducional dependente de O_2 de um fator de transcrição (TFs) específico, por uma via para degradação de proteínas (BAILEY-SERRES et al., 2012).

De um modo geral, Evans (2003) descreve os seguintes eventos de formação de aerênquima em milho:

- (i) Percepção da hipoxia; iniciação da biossíntese de etileno.
- (ii) Percepção do sinal do etileno pelas células do meio do córtex.
- (iii) Iniciação da morte celular; células começam a perder íons para o ambiente ao redor; Invaginação da membrana plasmática e aparecimento de vesículas nas células do córtex; primeiras mudanças na parede celular.
- (iv) Condensação da cromatina na periferia do núcleo; organelas intactas.
- (v) Aumento das enzimas hidrolíticas da parede; organelas envolvidas por membranas.
- (vi) Lise celular.
- (vii) Absorção do conteúdo celular e água pelas células vizinhas.
- (viii) Formação de lacunas limitadas por linhas de células intactas.

2.3.1.1 O Etileno

O etileno, um simples hidrocarboneto insaturado, é um hormônio gasoso, importante modulador do crescimento e desenvolvimento vegetal. Atua na germinação de sementes, diferenciação dos tecidos, formação dos primórdios radicular e caulinar, iniciação floral, polinização, síntese de antocianinas, desenvolvimento dos tricomas radiculares, nodulação da raiz, senescência floral, abscisão e maturação de frutos (BLEECKER; KENDE, 2000; ECKER, 1995; JOHNSON; ECKER, 1998), podendo sua produção ser regulada por sinais internos durante o desenvolvimento e em resposta a fatores ambientais bióticos ou abióticos (WANG; LI; ECKER, 2002). Em condições de estresse o aumento da síntese de etileno funciona como uma fase comum na cadeia de eventos que leva a uma variedade de respostas (GRICHKO; GLICK, 2001). No caso do alagamento, o etileno é considerado uma importante molécula sinalizadora, participando da formação de aerênquimas por meio de morte celular programada, iniciação de raízes adventícias, alongamento do caule e pecíolo (VOESENEK; SASIDHARAN, 2013).

Os mecanismos de síntese desse hormônio foram intensamente estudados. Observa-se que S-adenosilmetionina (SAM ou S-AdoMet) e ACC são os precursores do etileno (YANG; HOFFMAN, 1984). De acordo com Ravel et al. (1998), S-AdoMet é formado pela conversão do aminoácido metionina sob ação da enzima SAM-sintetase (ou AdoMet sintetase). Em uma etapa seguinte, S-AdoMet é convertido em ACC pela ação da enzima ACC sintase (ACS). Além de ACC, essa reação forma 5'-metiltioadenosina (MTA) que será convertido à metionina por meio do Ciclo de Yang, permitindo uma via contínua de síntese de etileno sem uma fonte crescente de metionina e a recuperação do enxofre. Por fim, o ACC é oxidado pela enzima ACC oxidase (ACO) em uma reação que necessita de O_2 , Fe^{2+} e ascorbato como cofatores,

formando etileno, CO₂, H₂O e cianeto que é convertido em β-cianoalanina pela β-cianoalanina sintase (YANG; HOFFMAN, 1984). O ACC também pode ser convertido em N-malonil ACC sob a ação da enzima N-maloniltransferase (NMT), que é transferido aos vacúolos (GRIERSON, 1998; THEOLOGIS et al., 1992).

As enzimas ACS e ACO são codificadas por membros de famílias multigênicas, sendo diferentemente regulados por uma complexa rede de sinais ambientais e de desenvolvimento, respondendo a estímulos internos e externos (VANDENBUSSCHE et al., 2012; WANG; LI; ECKER, 2002). Em milho (*Zea mays*), a família de genes ACS (*ZmACS*) é composta por três membros (*ZmACS2*, *ZmACS6* e *ZmACS7*), enquanto a família de genes ACO (*ZmACO*) é composta por quatro membros (*ZmACO15*, *ZmACO20*, *ZmACO31* e *ZmACO35*) (GALLIE; YOUNG, 2004). Geisler-Lee, Caldwell e Gallie (2010) observaram modificações na expressão destes genes ao investigar como a maquinaria biossintética do etileno é temporal e espacialmente regulada em raízes de milho sob hipoxia. Estes autores verificaram a expressão de todos os membros de *ZmACS* nas raízes de milho, sendo o gene *ZmACS6* expresso na coifa e na raiz e os genes *ZmACS2* e *ZmACS7* no córtex interno da zona de alongamento da raiz. Em condições de hipoxia a expressão dos genes *ZmACS2* e *ZmACS7* foi induzida na região cortical distal do ápice da raiz, enquanto a expressão de *ZmACS6* foi induzida próximo ao ápice radicular. Em relação aos genes *ZmACO*, a expressão da subfamília *ZmACO15/31* foi restrita a coifa e aos elementos crivados do protofloema, enquanto a expressão da subfamília *ZmACO20/35* foi confinada também a coifa e as células companheiras associadas ao protofloema. A hipoxia induziu maior expressão dos genes *ZmACO15* em comparação aos demais membros de *ZmACO*, sendo observada nas células corticais, além dos tecidos expressos em condições normais de oxigênio. Dessa forma, observaram que a indução da maquinaria biossintética do

etileno está correlacionada na produção de etileno em raízes de milho submetidas à hipoxia (GEISLER-LEE; CALDWELL; GALLIE, 2010).

Após sua síntese, o etileno é percebido e ocorre a transdução do sinal para respostas biológicas específicas. Essa percepção é feita por uma família de cinco receptores de membrana homólogos a dois componentes quinase histidina bacterianos, envolvidos na detecção de mudanças ambientais (KENDRICK; CHANG, 2008; WANG; LI; ECKER, 2002). O sistema consiste de duas proteínas: uma histidina quinase como o sensor que autofosforila um resíduo de histidina interno em resposta às mudanças ambientais, e um regulador *downstream* de resposta que ativa os componentes após receber um fosfato do resíduo de histidina do sensor no seu resíduo de aspartato (PIRRUNG, 1999; WURGLER-MURPHY; SAITO, 1997). Em *Arabidopsis* estes receptores, localizados nas membranas de Golgi e do retículo endoplasmático, são reguladores negativos da via de sinalização do etileno (DONG et al., 2010). Quando o etileno é ligado, juntamente com cofator de cobre ao domínio transmembrana N-terminal do receptor, este é inativado permitindo a ação do etileno. Os receptores interagem com os reguladores negativos (CTR1) e positivos (EIN2) da sinalização do etileno. Assim, na ausência de etileno, CTR1 estão associados aos receptores, impedindo a transferência de sinal para EIN2; após a ligação do etileno ao receptor ocorrem mudanças na conformação de CTR1, permitindo a interação de EIN2 com o domínio quinase dos receptores. A ativação de EIN2 induz o acúmulo de fatores de transcrição (FTs) EIN3 e EIN3-like (EIL), que induzem a transcrição de outros FTs, como os de resposta do etileno (ERF), responsável pela ativação dos genes alvo do etileno (STEPANOVA; ALONSO, 2009). Vários componentes dessa via são regulados por ubiquitinação e degradação de proteínas (VANDENBUSSCHE et al., 2012; VOESENEK; SASIDHARAN, 2013).

2.3.1.2 As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas produzidas pela redução incompleta de O_2 para H_2O em diferentes compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos por meio de processos metabólicos como fotossíntese, respiração e fotorrespiração (GILL; TUTEJA, 2010). Estas moléculas, que incluem o íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (HO^{\bullet}) e oxigênio singlete (1O_2), também podem ser geradas por complexos enzimáticos, como oxidases e peroxidases que produzem EROs em resposta a certos fatores ambientais (MARINO et al., 2012). Segundo Steffens (2014), EROs podem ser geradas no apoplasto por proteínas RBOH localizadas na membrana plasmática.

Em condições fisiológicas estáveis, as moléculas de EROs são removidas por diferentes mecanismos de defesa antioxidante (FOYER; NOCTOR, 2005). Contudo, a superprodução destas moléculas em resposta a fatores ambientais provoca um desbalanço no estado redox celular, chamado estresse oxidativo que provoca danos a proteínas, DNA e lipídeos. Como mecanismo de desintoxicação, um complexo sistema antioxidante enzimático e não enzimático atua sobre as moléculas de EROs (APEL; HIRT, 2004; MARINO et al., 2012; SUZUKI et al., 2011) minimizando seus efeitos nas células. Os antioxidantes não enzimáticos incluem componentes de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico (AsA), a glutathiona (GSH), o α -tocoferol, prolina, flavonóides e os carotenóides (BARBOSA et al., 2014; STEFFENS; STEFFEN-HEINS; SAUTER, 2013). Enquanto o sistema antioxidante enzimático é formado pelas enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR), peroxidase do guaicol (GPOX), peroxidase da glutathiona (GPX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR),

glutathione-S-transferase (GST) e polifenoloxidase (PPO) (BARBOSA et al., 2014; GILL; TUTEJA, 2010). A regulação da expressão de genes codificantes destas enzimas, cuja atividade evita ou reduz os danos potenciais causados pelas EROs, faz parte da resposta ao estresse (CYRNE et al., 2003).

Entre as enzimas antioxidantes, a metaloenzima SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos do aumento na geração de EROs nas células, catalisando a dismutação de dois radicais $O_2^{\cdot-}$, gerando H_2O_2 e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; MITTLER, 2002), além de reduzirem o risco de formação do HO^{\cdot} a partir do $O_2^{\cdot-}$ por meio da reação Habere-Weiss (GILL; TUTEJA, 2010). De acordo com seus cofatores metálicos, são classificadas em: Cu/ZnSOD (cobre e zinco), Mn-SOD (manganês) e Fe-SOD (ferro) (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2002). Em geral, as plantas contêm uma Mn-SOD localizada na matriz mitocondrial e uma Cu/Zn-SOD citosólica, com Fe-SOD e/ou Cu/ZnSOD, presentes no estroma do cloroplasto (BARBOSA et al., 2014).

Outra enzima importante na remoção de EROs, a APX é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas (BARBOSA et al., 2014), localizadas nos tilacoides (tAPX), membranas dos glioxissomos (gmAPX), solúvel no estroma dos cloroplastos (sAPX) e no citosol (cAPX) (GILL; TUTEJA, 2010). A APX tem alta afinidade pelo H_2O_2 e está envolvida na sua conversão em água, utilizando ácido ascórbico como redutor. Nos cloroplastos e mitocôndrias, a APX atua no ciclo ascorbato-glutathione, onde o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido pelo ascorbato (MITTLER, 2002). Nos cloroplastos, a fotorredução do oxigênio à água pode gerar $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , que são eliminados pela ação da SOD e da APX, respectivamente (ASADA, 2006). Estudos demonstram que a

expressão destas enzimas tem sido aprimorada durante diferentes condições de estresse (GILL; TUTEJA, 2010).

Além de seu potencial tóxico, as EROs têm sido consideradas moléculas de sinalização, envolvidas em diversos processos de desenvolvimento vegetal, como a morte celular programada (APEL; HIRT, 2004; OVERMYER; BROSCHE; KANGASJARVI, 2003). Nesse caso, a produção de EROs pode ser geneticamente programada, induzida durante o curso do desenvolvimento e por fatores ambientais (FOYER; NOCTOR, 2005), sendo geradas por complexos enzimáticos. Estes complexos incluem peroxidases classe III, oxalato oxidases, amina oxidases, lipoxigenases, quinona redutases e NAPH oxidases de plantas (NOx) (APEL; HIRT, 2004). NOx são conhecidos como explosão respiratória oxidase homóloga (RBOHs), homólogos a subunidade catalítica (gp91phox) de fagócitos de mamíferos (SAGI; FLUHR, 2006), atuando na sinalização mediada por EROs, como respostas de defesa, morte celular programada e desenvolvimento vegetal (TORRES; DANGL, 2005). RBOHs são proteínas integrais de membrana, compostas por seis domínios transmembranas com dois grupos heme, domínios FAD C-terminal e NADPH hidrofílico e dois domínios de ligação de cálcio N-terminal (SAGI; FLUHR, 2006). Em raízes de milho crescidas em condições de alagamento os genes RBOHs, pertencentes a uma pequena família multigênica composta de cinco grupos de sequência ortóloga (MARINO et al., 2011), são considerados fortemente *up* regulados nas células do córtex e fracamente *up* regulados no estelo e camadas externas das raízes (RAJHI et al., 2011). Em contraste, a expressão do gene (MT) que codifica a metalotioneína (MT2b), uma possível removedora de EROs, é constitutivamente expresso em todas as células do córtex, estelo e camadas externas das raízes de milho em condições aeróbicas. Na presença de etileno, estes genes são *down* regulados, sendo mal expressos nas células do córtex, embora ainda fortemente expressos nas células do estelo e nas camadas mais externas (RAJHI et al.,

2011). Dessa forma, a regulação dos genes RBOHs e MTs no córtex das raízes, provavelmente levam ao acúmulo de EROs que ativa os subsequentes processos envolvidos na formação lisígena de aerênquima nas raízes de milho (YAMAUCHI et al., 2013).

O H_2O_2 , resultado da redução univalente do oxigênio, desempenha um duplo papel nas plantas: em baixas concentrações atua como uma molécula sinalizadora, relacionada à tolerância ao estresse, e em altas concentrações está envolvido na morte celular (QUAN et al., 2008). Seu papel como regulador chave em processos fisiológicos, como senescência, fotorrespiração e fotossíntese, movimento dos estômatos, ciclo celular e crescimento e desenvolvimento (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012) já são conhecidos. No entanto, tem sido proposto seu papel como mensageiro secundário de sinais gerados pelas EROs, em razão de sua relativamente longa vida e alta permeabilidade por meio das membranas (QUAN et al., 2008). Alta produção de H_2O_2 pode ocorrer no apoplasto, onde uma classe de oxidases de membrana NADPH-dependentes (RBOH) são as principais fontes de síntese, além das peroxidase da parede celular, oxidases de amina e de oxalato. Outras fontes de síntese em diferentes compartimentos das células vegetais resultam do aumento do metabolismo e da redução de radicais superóxido catalisada pela SOD (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). A percepção de altos níveis de H_2O_2 pelas células deve ocorrer diretamente por fatores de transcrição (FTs) redox sensíveis que desencadeiam cascatas de reações (MILLER; SHULAEV; MITTLER, 2008). Além disso, uma via alternativa pode ser pela oxidação de metionina (Met) para o sulfóxido de metionina (MetSo), que unem sinais oxidativos para a mudanças no estado de fosforilação de proteínas (HARDIN et al., 2009).

Vários estudos demonstram que a hipoxia induz o aumento na produção de EROs, principalmente de H_2O_2 (BLOCKHINA et al., 2001; STEFFENS;

STEFFEN-HEINS; SAUTER, 2013; XU et al., 2013; YAMAUCHI et al., 2014; YAMAUCHI; RAJHI; NAKAZONO, 2011; YANG, 2014), que atuam como intermediários na sinalização das respostas à hipoxia controladas pelo etileno e, possivelmente, também independente do etileno (STEFFENS; STEFFEN-HEINS; SAUTER, 2013), como na morte celular. Com isso, Rajhi et al. (2011) e Yamauchi et al. (2014) sugerem que a geração de EROs mediada por RBOH contribui, pelo menos em parte, para a formação lisígena de aerênquima no córtex de raízes de milho sob alagamento.

2.3.1.3 A Morte Celular Programada

A formação de aerênquima lisígeno no córtex de raízes de milho é atribuída à morte celular programada (MCP) induzida pelo etileno, sendo caracterizada pela perda da coloração nuclear com laranja de acridina e perda da permeabilidade de membrana e da atividade da esterase, com diacetato de fluoresceína (DREW; HE; MORGAN, 2000; GUNAWARDENA et al., 2001). A MCP é caracterizada como um processo altamente regulado de suicídio celular essencial para o crescimento e sobrevivência em eucariotos (HATSUGAI et al., 2006). Em plantas, a MCP ocorre em vários processos como embriogênese, formação de aerênquima, processos reprodutivos, desenvolvimento das sementes e senescência das folhas (PENNEL; LAMB, 1997).

Segundo van Doorn (2011), existem duas classes de morte celular programada em plantas, definidas pela ruptura do tonoplasto seguida da eliminação de todo o citoplasma e da maior parte da parede celular. Assim, MCP pode ser autolítica, onde a ruptura do tonoplasto e eliminação do citoplasma fazem parte do processo de morte da célula e não autolítica, onde estes processos ocorrem após a morte celular. Inúmeras modificações morfológicas e

bioquímicas que antecedem estes processos celulares incluem a condensação da cromatina ou do núcleo, o aumento de estruturas envolvidas na degradação inicial do citoplasma, como vesículas e vacúolo (VAN DOORN, 2011), apresentando ocorrências variáveis entre os diferentes casos de MCP. De acordo com van Doorn e Woltering (2005) e Kuroyanagi et al. (2005), uma protease localizada no vacúolo (VPE) apresenta atividade como caspase-1 que regula a morte celular. No caso de animais, a MCP está organizada por caspases, proteases de cisteínas que modificam e ativam várias proteínas atuantes na manutenção da integridade celular. Vários estudos demonstram que plantas apresentam componentes com atividade semelhante a caspases (LAM; KATO; LAWTON, 2001; WOLTERING; VAN DER BENT; HOEBERICHTS, 2002). Em decorrência da ausência de fagócitos e da presença de uma parede celular rígida, a VPE tem papel fundamental pela ativação das proteínas alvo que provocam a desintegração das membranas vacuolares. Conseqüentemente, as enzimas hidrolíticas vacuolares saem do vacúolo para o citosol e degradam os componentes das células vegetais (HATSUGAI et al., 2006).

A MCP é considerada uma estratégia adaptativa em resposta a estresses abióticos e bióticos (SARKAR; GLADISH, 2012), como na formação lisígena de aerênquimas induzida por hipoxia. Estudos demonstram o envolvimento do etileno nesse processo, agindo por meio de proteínas G heterotriméricas (VAN HAUTEGEM et al., 2015). As proteínas G heteroméricas, reconhecidas como importantes transdutores de sinais em vias de sinalização de hipoxia, têm subunidades codificadas por um ou cinco genes (STEFFENS; SAUTER, 2010). Alguns estudos demonstram que a proteína G atua *downstream* ao etileno e H_2O_2 como um regulador positivo da morte celular (SUHARSONO et al., 2002; TSUKUDA et al., 2002), mas pouco é conhecido sobre as vias de sinalização e as respostas celulares e fisiológicas resultantes (STEFFENS; SAUTER, 2010). Uma hipótese seria a ativação de uma fosfolipase C pela proteína G, liberando

IP₃ (inositol 1,4,5 trifosfato) e diacilglicerol a partir do fosfatidilinositol bifosfato ligado à membrana plasmática. O IP₃ se ligaria ao retículo endoplasmático ou tonoplasto abrindo canais de Ca⁺² e, assim, aumentando Ca⁺² citosólico. O Ca⁺², envolvido na sinalização celular sob baixas condições de oxigênio, atua também na ativação de proteínas quinases que levam à fosforilação de proteínas durante o processo de morte celular nas células corticais de raízes de milho (DREW; HE; MORGAN, 2000).

Steffens, Steffen-Heins e Sauter (2013) afirmam que EROs também podem desempenhar um papel na formação de aerênquima lisígeno, talvez independentemente de etileno. Em milho, os genes RBOHs são *up* regulados nas células corticais e reprimidos nas células externas de raízes submetidas à baixa concentração de oxigênio, sugerindo que uma produção local de EROs pode promover a MCP de células individuais (YAMAUCHI et al., 2013). Nesse caso, ocorre uma perturbação nuclear e colapso celular, formando os espaços limitados por células vivas que mantêm a integridade estrutural do tecido (VAN HAUTEGEM et al., 2015).

2.3.1.4 A Degradação da Parede Celular

As paredes celulares, as matrizes extracitoplasmáticas de células vegetais, consistem de um arranjo ordenado de microfibrilas de celulose embebidas numa matriz de polissacarídeos (hemiceluloses e pectinas) e proteínas estruturais (glicoproteínas) (COSGROVE, 2005; EMONS; MULDER, 2000; JARVIS, 2011), formando uma rígida estrutura envolvendo as células (BABU; BAYER, 2014). Além destes compostos, a parede celular pode conter lignina, água e substâncias incrustantes tais como cutina, suberina e certos compostos inorgânicos que variam entre espécies vegetais e tipos de células (SHOWALTER, 1993). Um dos principais componentes da parede celular, a

celulose, um β -1,4-glucano linear, é produzida na forma de microfibrilas longas de celulose, resultantes da associação de moléculas individuais de celulose por ligações de hidrogênio, em matrizes cristalinas ou semicristalinas fortes e resistentes (COSGROVE, 2005; EMONS; MULDER, 2000; JARVIS, 2011). Outro componente importante da parede celular, as pectinas são um dos polissacarídeos mais complexos, podendo formar géis hidratados (BABU; BAYER, 2014). Consistem em uma estrutura de ligações axiais de unidades de ácido α -1, 4-D-galacturônico, contendo moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose como correntes laterais (ATMODJO; HAO; MOHNEN, 2013; MOHNEN, 2008). São importantes determinantes da porosidade e espessura da parede, além de estarem presente na lamela média (COSGROVE, 2005).

Durante a morte celular programada, a lise do citoplasma é acompanhada pela degradação enzimática da parede celular. Mudanças na esterificação de pectinas na parede de células corticais de raízes de milho são observadas durante a morte celular (GUNAWARDENA et al., 2001). Em seguida, a parede celular é degradada pela ação combinada de enzimas pectinolíticas, xilanolíticas e celulósicas (EVANS, 2003). Dentre estas, a celulase é a mais estudada, sendo classificada de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND et al., 2002). A celulase, que catalisa a degradação da celulose da parede a resíduos de monossacarídeos (glicose) (WANG et al., 2009), pode ser coordenadamente ativada ou liberada de compartimentos intracelulares antes da autólise. Segundo He et al. (1996), a atividade máxima da celulase em raízes de milho coincide com a formação de aerênquima, sendo totalmente perdida após a completa degradação da parede celular.

Além da celulase, pectinases desempenham papel fundamental na degradação de parede, atuando no afrouxamento inicial que permitirá o acesso de enzimas degradativas ao conteúdo da parede, durante a formação de aerênquimas (BRAGINA; RODIONOVA; GRINIEVA, 2003). Dentre estas, destaca-se a hidrolase poligalacturonase (PG), que hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pécico (KAYSHAP et al., 2001; MUTLU et al., 1999).

Assim, de um modo geral a degradação da parede celular, durante a formação de aerênquima, tem início por meio da digestão dos polissacarídeos pécicos pelas pectinases, como a PG que está relacionada à permeabilidade da parede celular (RADIONOVA et al., 2001); da hidrólise de hemiceluloses, como arabinoglucuronoxilanos por endo-1,4- β -xilânase; e da clivagem das ligações glicosídicas β (1,4) de moléculas de celulose e hemicelulose pela celulase (HE et al., 1996). Conforme Bragina, Rodionova e Grinieva (2003) e He et al. (1996), existe relação entre produção de etileno e atividade destas enzimas em plantas de milho sob alagamento.

2.4 Milho ‘Saracura’

O Brasil é responsável pela terceira maior produção mundial de milho, prevista em 75 milhões de toneladas pelo 9º levantamento da safra mundial de milho 2014/15 do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Estima-se um total de 15 milhões de hectares de área plantada na safra 2014/2015 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Apesar dessa grande área destinada ao plantio de milho, o país possui, aproximadamente, 28 milhões de hectares de terras com potencial agrícola

suscetíveis ao alagamento (VITORINO et al., 2001). Com isso, no Brasil, planície de inundação ou área úmida (aluvial ou solos hidromórficos) com alagamento temporário restringe a diversidade da agricultura apenas para o cultivo do arroz (SILVA et al., 2007). Assim, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS/EMBRAPA) desenvolveu, por meio de seleção fenotípica recorrente, uma cultivar de milho denominada Saracura-BRS 4154, que é capaz de sobreviver, produzir e tolerar inundações periódicas no solo. O nome ‘Saracura’ é uma referência a um pássaro normalmente encontrado em região pantanosa (FERREIRA; MAGALHÃES; BORÉM, 2008; PARENTONI et al., 1997).

A cultivar possui ciclo precoce, altura das plantas de 2,35 m, altura de inserção da espiga de 1,32 m, potencial produtivo de 5 a 6,5 t/ha, muito bom empalhamento, sanidade das espigas, resistência ao acamamento e quebramento, grãos semiduros de cor laranja (EMBRAPA, 2015).

Estudos, que constataram aumento da porosidade radicular do primeiro para o quarto ciclo (PARENTONI et al., 1995), foram complementados por trabalhos que demonstraram vários mecanismos bioquímicos e morfológicos relacionados à capacidade de suportar períodos intermitentes de inundação pelos diferentes ciclos de seleção, como a formação de aerênquima (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; FRIES et al., 2007; PEREIRA et al., 2008, 2010; SOUZA et al., 2009, 2011, 2012), envolvimento do cálcio e atividades enzimáticas (DANTAS; ARAGÃO; ALVES, 2001; FERRER et al., 2004; FRIES, 2006; MAGALHÃES et al., 2007; PORTO et al., 2013), além de outros mecanismos de tolerância (FERREIRA; MAGALHÃES; BORÉM, 2008; LOPES et al., 2005; MELO et al., 2007; SOUZA et al., 2010, 2012).

Atualmente, a cultivar encontra-se no 18º ciclo de seleção anual e, de acordo com Pereira et al. (2008, 2010) e Souza et al. (2009, 2011), o aumento na

proporção de aerênquima nas raízes de milho Saracura é fundamental na tolerância ao alagamento dos sucessivos ciclos de seleção.

Entretanto, ainda não foi estudado o papel do etileno e do peróxido de hidrogênio na formação deste tecido em milho 'Saracura' ao longo do tempo de alagamento, considerando o efeito da seleção genética e o potencial de tolerância desta cultivar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal (sementes), disponibilizado pela Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, consistiu de ciclos de seleção anual da variedade de milho (*Zea mays*) Saracura – BRS 4154, com níveis crescentes de tolerância ao alagamento (C1, C5, C11 e C18) (ALVES et al., 2002; FERREIRA; MAGALHÃES; BORÉM, 2008; PEREIRA et al., 2010) além da variedade suscetível ao alagamento BR 107 como controle.

3.2 Condições de crescimento

A germinação das sementes ocorreu em vasos de plástico de 4 litros, contendo vermiculita expandida como substrato em condições de umidade, temperatura e luminosidade ambientes, em casa de vegetação no Departamento de Ciências do Solo, na Universidade Federal de Lavras. A adubação foi realizada com solução nutritiva de acordo com Malavolta (1980), no momento do plantio e em duas aplicações posteriores, no período de duas semanas. A irrigação foi realizada regularmente, mantendo a umidade ideal do substrato.

Foram semeadas seis sementes por vaso, com posterior desbaste para 4 plantas no início da exposição aos tratamentos.

3.3 Imposição dos tratamentos

Os experimentos de alagamento, realizados em casa de vegetação no Departamento de Ciências do Solo, na Universidade Federal de Lavras, foram iniciados no estágio V6 (caracterizado por seis folhas totalmente desenvolvidas,

quando a região de crescimento e o pendão estão acima da superfície do solo e o colmo está iniciando um período de grande incremento da elongação). Os vasos com as plantas foram alagados (lâmina de água na altura da primeira folha) durante 7 dias, mantendo condições acima da capacidade de campo do substrato, sendo realizadas coletas ao longo do tempo: 0 (sem alagamento), 1, 3, 5 e 7 dias. O período experimental foi estabelecido com base na literatura e no tempo necessário para indução das respostas das plantas à condição do meio.

A montagem do experimento foi realizada em DIC, em esquema fatorial 5 (4 ciclos de seleção + variedade sensível) x 5 (tempo de alagamento), com um vaso por parcela e três repetições. Para a realização das análises bioquímicas e de expressão gênica, houve modificações no delineamento, considerando apenas os extremos de tolerância em relação à formação de aerênquima (PEREIRA et al., 2008, 2010; SOUZA et al., 2009, 2011), sendo em fatorial 3 (BR 107, C1 e C18) x 3 (0, 1 e 7 dias) e 2 (C1 e C18) x 3 (0, 1 e 7 dias), respectivamente.

3.4 Análise da expressão das enzimas ACC sintase, ACC oxidase, dismutase do superóxido e peroxidase do ascorbato por meio de técnicas de qRT-PCR

Para as análises, raízes completas (contendo todas as regiões) de milho nas diferentes condições experimentais foram coletadas e armazenadas a -80°C.

A expressão dos genes pela técnica de qRT-PCR, realizada no Laboratório de Análises de Sementes, do Departamento de Agricultura, foi dividida em: Extração e Purificação do RNA, Transcrição reversa para síntese de cDNA, Seleção dos *primers*, PCR em tempo real e Análise dos resultados.

Extração e purificação do RNA

Para a extração do RNA, o material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, com adição do reagente *Pure Link RNA Plant*[®] (*invitrogen*), de acordo com as especificações do fabricante.

Foram utilizadas eletroforese em gel de agarose 1,5% (corados com Gel red) e espectrofotômetro (*NanoVue*) para avaliar a integridade e pureza do RNA.

Após a extração dos ácidos nucleicos, as amostras foram tratadas com DNase *Free* para evitar a contaminação com DNA, utilizando o *Kit DNase Free*[®] AMBIOM segundo as recomendações do fabricante.

A eficiência do tratamento com DNase foi comprovada por uma reação de PCR convencional, tendo como controle positivo todas as amostras do milho e utilizando o *primer* correspondente ao gene Ubiquitina.

Transcrição reversa para a síntese do cDNA

Para essa análise foram utilizados os mRNAs como molde para a síntese de cDNA. Para isso foi utilizado o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA*[®] da *Applied Biosystems*, conforme protocolo do fabricante.

Seleção dos primers

Os genes foram selecionados, com base em revisão de literatura, considerando as duas enzimas da rota biossintética do etileno, ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO), já conhecidos por sua expressão regulada em raízes de milho (*Zea mays* L.) sob condições de hipoxia e duas enzimas do sistema antioxidante, dismutase do superóxido (SOD) e peroxidase do ascorbato

(APX), importantes no mecanismo de remoção do excesso de EROs geradas sob hipoxia.

As sequências dos *primers* que foram utilizados nas análises são representados na Tabela 1. Além disso, foi utilizado como controle endógeno o gene da Ubiquitina.

Análise dos resultados

As amostras de menor expressão, para cada gene, foram utilizadas como amostras calibradoras e o método utilizado para medir a expressão relativa foi o Método da Curva Padrão Relativo descrito no manual do aparelho (*Applied Biosystems*). Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de *PCR* em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de *mRNA's* das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de *mRNA's* de controle. Após a obtenção dos dados brutos, estes foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$. Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1 Sequências dos *primers* utilizados na análise de qRT-PCR em raízes de milho Saracura submetido ao alagamento

Gene	Identificação		Sequência 5'-----3'
ZmACS2	ACC sintase	F	ATCGCGTACAGCCTCTCCAAGGA
		R	GATAGTCTTTTGTCAACCATCCCATAGA
ZmACS6	ACC sintase	F	AGCTGTGGAAGAAGGTGGTCTTCGAGGT
		R	AGTACGTGACCGTGGTTTCTATGA
ZmACS7	ACC sintase	F	ATCGCGTACAGCCTCTCCAAGGA
		R	CAACGTCTCTGTCACCTCTGTGTAATGT
ZmACO15	ACC oxidase	F	CTCGTCTTCGATCAATTCCCAAGT
		R	TACATTATCATTATTTCTCCGGCTGT
ZmACO20	ACC oxidase	F	CTCATCCTGCTGCTCCAGGACGAC
		R	TCCACGATACACGCATAACCACCGT
ZmACO31	ACC oxidase	F	CTCGTCTTCGATCAATTCCCAAGT
		R	ATAGCAAAGAGGGCAACTAGCTAGT
ZmACO35	ACC oxidase	F	CTCATCCTGCTGCTCCAGGACGAC
		R	ACACACATAACTGTGCCACTATAAGCA
Ubiquitina (UBI) *	Controle endógeno	F	GTC AGT AAG TCATGG GTC GT
		R	ACA TAA TGA GCACAG GCT TT
SOD4*	Dismutase do superóxido	F	TGGAGCACCAGAAGATGA
		R	CTCGTGTCC ACCCTTTCC
cAPX*	Peroxidase do ascorbato	R	TGAGCGACCAGGACATTG
		F	GAGGGCTTTGTCA CTTGGT

(F) sequência do *primer forward* e (R) sequência do *primer reverse*

**Primers* que amplificaram para as raízes de milho Saracura nas condições estudadas. *PCR em tempo real*

3.5 Atividade enzimática da ACC oxidase (ACO) (EC 1.14.17.4)

A atividade enzimática da ACO foi determinada por meio da produção de etileno obtida após 1 hora de incubação de uma solução contendo o extrato das raízes e ACC.

O processo de extração foi modificado conforme Britsch e Grisebach (1986), onde 0,5 g de material vegetal fresco (raízes completas) foi macerado com nitrogênio líquido e solução tampão de extração contendo Tris 0,1 M (pH 7,2), glicerol 10% (v/v), ascorbato de sódio 30 mM e PVPP 5% (m/v). Em seguida realizou-se a centrifugação a 28000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

A atividade da enzima ACO foi determinada de acordo com Fernandez-Maculet e Yang (1992) com modificações, onde se adicionaram 1,7 mL da solução tampão de extração (sem PVPP), FeSO_4 50 μM , ACC 1 mM 0,2 mL do extrato. Em seguida, procedeu-se à incubação em banho-maria a 30°C por 1 hora em tubos vedados. Amostras de 10 mL da atmosfera interna de cada tubo foram coletadas com auxílio de uma seringa e transferidas para tubos de vácuo timer. Posteriormente, a produção de etileno foi determinada no Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças, do Departamento de Ciências dos Alimentos em cromatógrafo gasoso CG 2010, equipado com detector de ionização de chamas e coluna Carboxen (50946-03A) (30m x 0,53 m x 1 μm). A temperatura do injetor e da coluna foi de 150°C, enquanto a do detector foi de 245°C, com a rampa de aquecimento à 120°C por 1min e de 25°C a 230°C por 5 min, sendo o tempo total da corrida de 10,40 min. As áreas de pico foram transformadas em $\mu\text{L L}^{-1}$ mediante fator de correção obtido pela injeção de um gás padrão com concentração de etileno conhecida. A produção de etileno foi expressa em $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

3.6 Determinação da produção de etileno

A determinação do etileno produzido pelas raízes foi realizada de acordo com Geisler-Lee, Caldwell e Gallie (2010) com modificações.

Raízes completas destacadas foram pesadas em balança analítica e colocadas em frascos de vidro com cerca de 0,5 mL de água deionizada para manter a hidratação do material. Os frascos foram vedados e incubados durante 2 horas.

Com auxílio de uma seringa de 10 mL, coletou-se uma amostra da atmosfera interna de cada frasco, que foi transferida para tubos de vácuo timer de 10 mL. Em seguida, a concentração de etileno produzida pelas raízes foi determinada usando um sistema de cromatografia gasosa conforme descrito anteriormente. No cálculo da produção de etileno das amostras de raízes, levou-se em consideração a massa fresca das raízes e o tempo de acúmulo de etileno. Os resultados foram expressos em $\mu\text{L C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$.

3.7 Determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado, conforme Velikova, Yordanov e Edreva (2000), no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas.

Para a extração, 200mg de tecido vegetal fresco (raízes completas) foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e centrifugados a 12000 g por 15 minutos, a 4°C.

Em seguida adicionou-se a 45 μL de extrato um meio de reação contendo 45 μl de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7 e 90 μL de iodeto de potássio 1 M. A determinação do conteúdo de peróxido ocorreu pela leitura da absorbância

em 390nm e elaboração de curva padrão de calibração de H₂O₂ construída a partir de uma solução de H₂O₂ 250 µM, com R² = 0,9932.

3.8 Atividade enzimática da celulase (EC 3.2.1.4)

A determinação da atividade enzimática da celulase foi realizada, segundo Walker et al. (2006) com modificações, no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, do Departamento de Biologia.

Dessa forma, 0,3 g de material vegetal fresco (raízes completas) foram macerados em nitrogênio líquido e adicionado a 1,5 mL de NaCl 1 M para obtenção do extrato, que foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a atividade enzimática.

Em seguida, adicionaram-se 400µL de carboximetil-celulose 1% (m/v) a 400µL de extrato enzimático, que foi incubado em banho-maria a 30°C por 1 hora. As amostras foram, então, desproteinizadas pela adição de 120µL de hidróxido de bário 0,3 N, 120µL de sulfato de zinco 5% e 800µL água destilada, com centrifugação a 8000g para separação do desproteinado.

A determinação da atividade da celulase foi realizada por meio do método de DNS (ácido dinitrosalicílico) (MILLER, 1958), pela adição de 400µL de DNS a diferentes alíquotas das amostras desproteinizadas, com ebulição por 10 minutos e leitura da absorbância a 540nm. Uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para quebrar 1µmol de açúcares redutores por hora.

3.9 Atividade enzimática da poligalacturonase (PG) (EC 3.2.1.15)

A extração da poligalacturonase foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, de acordo com Buescher e

Furmanski (1978) com modificações de Vilas-Boas (1995). O doseamento foi realizado conforme Marcovic et al. (1975), com modificações de Vilas-Boas (1995).

Para obtenção do extrato, 1,5 g de tecido vegetal fresco (raízes completas) congelado a -80°C foi macerado com nitrogênio líquido e lavado pela adição de 25 mL de etanol 95% gelado. Posteriormente, adicionaram-se 6 mL de NaCl 1 M à 4°C e ajustou-se o pH das amostras para 6, com adição de NaOH 1 N. As amostras foram incubadas a 4°C por 1 hora.

A determinação da atividade enzimática foi realizada pela adição de 1 mL de pectina cítrica a 2 mL de extrato enzimático, sendo deixados em incubação em banho-maria a 30°C por 3 horas. Em seguida, a reação foi paralisada pela fervura das amostras durante 5 minutos.

A seguir, realizou-se a desproteíntização das amostras pela adição de 1,2 mL de hidróxido de bário 0,3 N, 1,2 mL de sulfato de zinco 5% e 8 mL de água destilada. Após agitação e filtração das amostras, alíquotas do desproteíntizado foram utilizadas para determinação da atividade enzimática pelo método de Smoghi-Nelson (NELSON, 1944) e leitura da absorbância a 510nm. A atividade foi expressa em ηmol de ácido galacturônico $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

Para cada amostra preparou-se um branco que consistiu de 2 mL de extrato enzimático, sem adição de pectina cítrica. Após fervura por 5 minutos, procedeu-se à desproteíntização pela adição de 1,2 mL de hidróxido de bário 0,3 N, 1,2 mL de sulfato de zinco 5% e 9 mL de água destilada. Realizou-se a agitação, filtração e determinação por Smoghi-Nelson (NELSON, 1944). A leitura da absorbância do branco foi utilizada para o cálculo da atividade enzimática.

3.10 Análises anatômicas da raiz

Raízes completas foram coletadas e fixadas em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e etanol 70%) por 72 horas e, então, preservadas em etanol 70%. Para as análises, o material foi submetido a uma série etanólica crescente para desidratação (70, 80, 90 e 100%), a temperatura ambiente de acordo com Johansen (1940), com modificações. Em seguida o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1), segundo as instruções do fabricante (kit Historesina Leica) por 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se à infiltração em resina base por mais 24 horas a 4°C. Para a polimerização foi utilizado o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). As seções transversais (fragmentos de 1cm removidos a partir de 10cm do ápice) e seções longitudinais do ápice radicular (fragmentos de 1cm) foram realizadas em micrótomo rotativo semiautomático, em espessura de 8 µm, sendo em seguida corados em solução de Azul de Toluidina 1%, pH 6,7 (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram fotografadas com câmera Zeiss AxioCam Erc 5s acoplada ao microscópio modelo Zeiss Axio Lab.A1 e as análises de micromorfometria realizadas em um *software* de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). Foi confeccionada uma lâmina por repetição, onde seis campos de observação foram analisados e fotografados. Para as análises de micromorfometria foram avaliadas as seguintes características anatômicas: proporção de aerênquima no córtex, área do córtex radicular, espessura da epiderme, espessura da exoderme e espessura da endoderme. Foram realizadas quatro medições de cada característica anatômica, em cada fotomicrografia, para a determinação das médias dos tratamentos. A proporção da área ocupada pelo aerênquima no córtex foi calculada com base na divisão da área total de aerênquima formado pela área total do córtex.

Considerando a proporção de aerênquima, estimou-se a Taxa de formação de aerênquima (TFA) ao longo do tempo, tendo como base a fórmula matemática da Taxa de Crescimento Absoluto (TCA), de acordo com Poorter (1989) e Benincasa (2003), como segue:

$$TFA = PA_2 - PA_1 / t_2 - t_1$$

Onde: PA= proporção de aerênquima; t= tempo em dias; 1 e 2= amostras sucessivas.

3.11 Análises estatísticas

Foram calculados a média e o desvio padrão para todas as variáveis analisadas. A normalidade dos dados foi verificada pelo Teste de Shapiro Wilk e a transformação $\ln(x)$ foi aplicada aos dados sem distribuição normal.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias testadas pelo Teste de Scott-Knott para $P < 0,05$ com auxílio do *software* estatístico Sisvar (FERREIRA, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O papel do etileno na formação de aerênquima nas raízes de diferentes ciclos de milho ‘Saracura’ sob alagamento foi avaliado por meio das análises de expressão dos genes das enzimas ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO), de atividade da ACC oxidase (ACO) e de produção de etileno.

As análises de expressão gênica demonstraram que, nas condições experimentais avaliadas e com as concentrações das amostras e *primers* utilizadas, os genes selecionados não foram expressos nas raízes de milho ‘Saracura’, embora a extração com *Pure Link RNA Plant*[®] tenha gerado RNAs totais de qualidade, íntegros e livres de impurezas e a amplificação utilizando os *primers* do gene constitutivo tenha demonstrado alta viabilidade dos cDNAs construídos. Considerando que a codificação dos genes das enzimas ACS e ACO pode ser diferencialmente regulada por uma complexa rede de sinais ambientais e de desenvolvimento (VANDENBUSSCHE et al., 2012; WANG; LI; ECKER, 2002), infere-se que nas condições analisadas a expressão das sequências selecionadas não foi estimulada. Nesse contexto, fatores epigenéticos podem influenciar os níveis de expressão, podendo levar à inativação do gene por inibição da transcrição ou do acúmulo do RNAm. Esse fenômeno, denominado silenciamento de genes, pode ser influenciado pelo local de inserção do transgene e está associado à metilação do DNA receptor, variações de histonas e modificações pós - traducionais de histonas (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; VAUCHERET et al., 1998). No entanto, outros estudos ainda precisam ser realizados.

Ao contrário deste estudo, Geisler-Lee, Caldwell e Gallie (2010) observaram modificações na expressão destes genes sob hipoxia em raízes de milho da linhagem B73 (sensível ao estresse hídrico) desenvolvida pela

Universidade do Estado de Iowa, EUA. No caso, os autores constataram a indução da expressão destes genes nas raízes expostas a 4% de oxigênio.

Em relação à atividade da ACO (Figura 1), houve interação entre os fatores tempo de alagamento e ciclo de seleção. Verificou-se variação na atividade enzimática, com aumento ao final do período de avaliação, exceto em BR 107. De modo semelhante, He, Drew e Morgan (1994) e He et al. (1996) relataram o aumento na atividade de ACO em raízes de milho cv TX 5855 submetidas à hipoxia, o que resultou na maior produção de etileno e formação de aerênquima lisígeno.

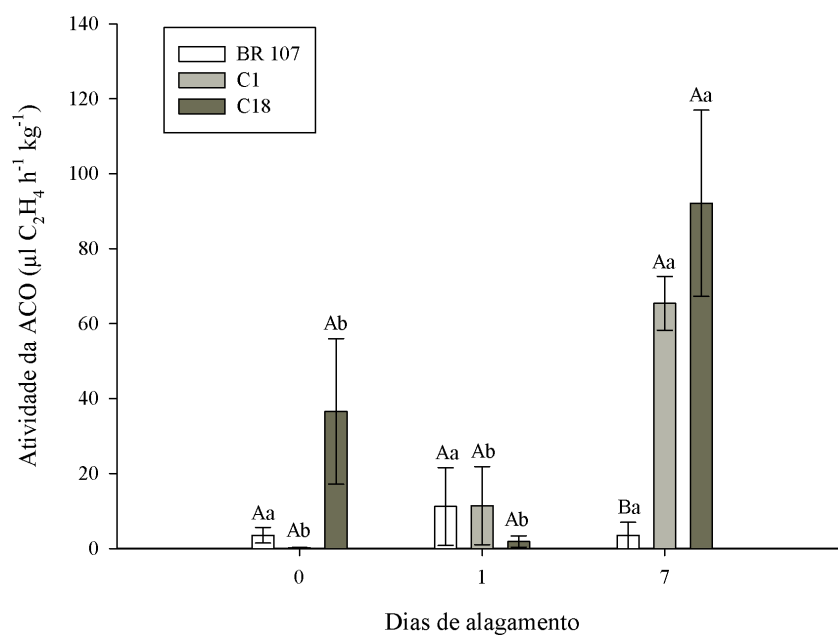


Figura 1 Atividade enzimática da ACC oxidase em raízes de milho 'Saracura' ciclos de seleção C1 e C18 e variedade sensível BR 107 submetidos ao alagamento, determinada pela produção de etileno após 1h de incubação. As barras indicam o erro padrão. As letras maiúsculas comparam as médias dos ciclos de seleção dentro de cada tempo, enquanto as letras minúsculas comparam o tempo de alagamento em cada ciclo de seleção com base no Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

Assim, embora a expressão dos genes da enzima ACO não tenha sido detectada, sua atividade foi afetada pelo alagamento. Muitas vezes os resultados obtidos em análises de transcriptômica não coincidem com os de análise proteômica, em função das várias alterações que podem ocorrer no mRNA até que codifique para uma proteína, como as resultantes da regulação epigenética. Com isso, pode-se detectar a presença do mRNA, mas não da proteína. Por se tratar de um elemento altamente dinâmico, que varia de acordo com o estado celular e em resposta às condições externas ao organismo, o conjunto de proteínas sintetizadas não retrata somente as respostas moleculares em determinado momento biológico, mas também mostra variações em seu próprio conjunto de proteínas pela presença de isoformas ou de modificações pós-traducionais das proteínas (HOOG; MANN, 2004). Por outro lado, o oposto também pode ocorrer, pois uma mesma proteína pode ser codificada por diferentes sequências de nucleotídeos. De acordo com D'Onofrio e Abel (2014), duas linhas independentes coexistem na mesma sequência de nucleotídeos, em virtude da redundância do código genético. Assim, para estes autores, ter múltiplos códigos de códons prescrevendo o mesmo aminoácido permite que qualquer dessas prescrições redundantes tenha uma codificação alternativa, que pode produzir funções diferentes. Neste estudo, analisou-se apenas uma sequência de nucleotídeos para cada mRNA, o que talvez contribua para os resultados observados, uma vez que outras sequências podem estar envolvidas na codificação da ACO.

Os resultados de produção de etileno pelas raízes demonstraram interação entre as variáveis tempo e ciclo de seleção. Observou-se uma variação na produção de etileno (Figura 2) ao longo do tempo, com exceção da variedade BR 107, que se manteve reduzida em comparação aos ciclos de seleção. Picos de produção de etileno tiveram início após um dia de alagamento em C18 (15 vezes maior que a produção de BR 107), no 3º dia em C1 (seis vezes maior que a

produção de BR 107) e C5 (oito vezes maior que a produção de BR 107) e no 5º dia em C11 (700 vezes maior que a produção de BR 107). Observou-se ainda que, embora, C18 não tenha apresentado a maior produção de etileno, esta foi estimulada mais rapidamente, o que talvez represente uma estratégia de tolerância.

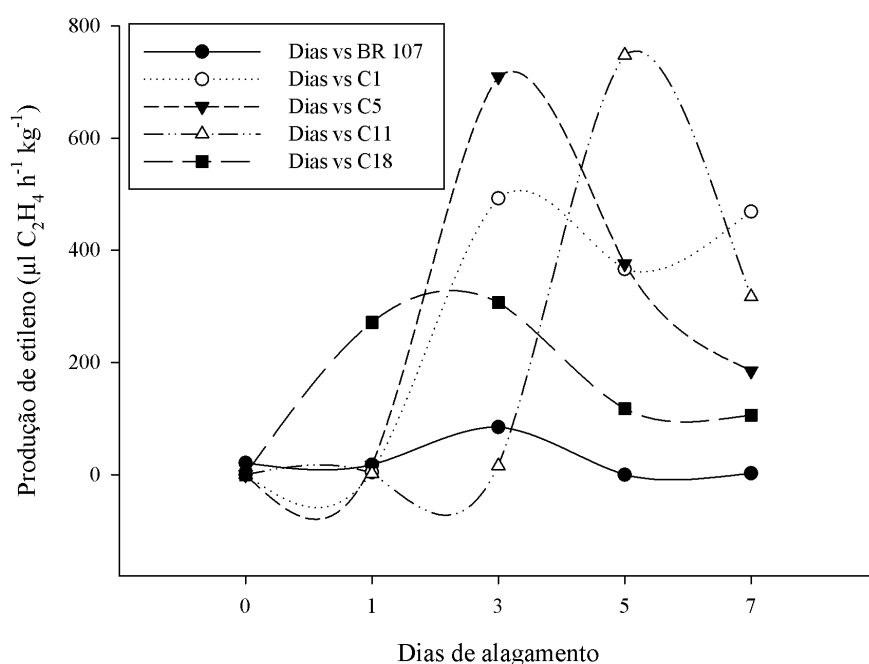


Figura 2 Produção de etileno em raízes de ciclos de seleção de milho 'Saracura' submetidos ao alagamento por 7 dias. Utilizou-se o modelo *Multiple spline curve lines & scatter* para representar os dados

Ao observar os resultados de atividade de ACO e produção de etileno em BR 107, C1 e C18 com 0, 1 e 7 dias de alagamento, nota-se certa correspondência entre a produção de etileno e a atividade enzimática de ACO. Em BR 107, a atividade de ACO foi reduzida, assim como a produção de etileno ao longo do tempo. Em C1, houve aumento da atividade enzimática com base

em um dia de alagamento, sendo acompanhada pelo aumento na produção de etileno após o 3º dia de avaliação. Por outro lado, em C18, enquanto a atividade enzimática apresentou redução no 1º dia e aumento no 7º dia de alagamento, a produção de etileno aumentou desde o início do alagamento e reduziu drasticamente ao fim do período avaliado. Nesse caso, pode-se inferir que a produção de etileno inicial foi resultado de uma provável maior atividade da enzima nos momentos iniciais do alagamento. Segundo English et al. (1995), solos alagados aumentam a atividade de ACO em *Lycopersicon esculentum* dentro de 6 a 12 horas em associação com rápidas taxas de produção de etileno. Do mesmo modo, He et al. (1996) verificaram aumento na atividade de ACO e na produção de etileno em raízes de milho em até 4 horas após exposição a 4% de oxigênio. No entanto, no presente estudo não foi avaliada a atividade enzimática nesses momentos iniciais. Em relação à queda na produção de etileno em C18, é possível que a concentração de ACC como substrato possa ter sido um fator limitante, uma vez que atividade de ACO foi alta. Nesse sentido, Vandenbussche et al. (2012) afirmaram que a atividade da ACC pode ser indicativa da produção de etileno, porém esta dependerá também, obviamente, da presença de ACC. Além disso, He, Morgan e Drew (1992) afirmaram que, apesar da queda na taxa de produção de etileno, as células da raiz de milho tornaram-se mais sensíveis ao hormônio, permitindo a continuidade na formação de aerênquima em condições de deficiência nutricional. Deve-se considerar, também, que a produção de etileno, mediada pelo nível de expressão dos genes de biossíntese, depende do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento (DUGARDEYN; VAN DER STRAETEN, 2008; VANDENBUSSCHE et al., 2012).

Vandenbussche et al. (2012) destacaram, ainda, a existência de limitações nos métodos de mensuração de etileno nos tecidos vegetais por não permitirem determinar com clareza a produção de etileno em nível de tipo de

célula em um órgão ou tecido, uma vez que não consideram as características de transporte de ACC e etileno entre as células e a difusão do hormônio para o ambiente.

De acordo com vários estudos, o etileno está envolvido na formação lisígena de aerênquima em milho em condições de hipoxia (DREW; HE; MORGAN, 1989, 2000; GEISLER-LEE; CALDWELL; GALLIE, 2010; HE et al., 1996; HE; MORGAN; DREW, 1996; JACKSON; ARMSTRONG, 1999; YAMAUCHI et al., 2013), pela morte celular programada e autólise da parede celular (EVANS, 2003). Nesse sentido, Geisler-Lee, Caldwell e Gallie (2010) constataram aumento na produção de etileno em raízes de milho da linhagem B73 submetidas a 4% de oxigênio por até 12 horas da imposição dos tratamentos; a partir de 24 horas observou-se redução nessa produção. No entanto, segundo os autores, a formação continuada de aerênquima por pelo menos quatro dias sugere que a síntese de etileno estava em curso durante este período. De forma semelhante, uma redução na produção de etileno nas raízes de milho 'Saracura' a partir do 5º dia de alagamento foi observada neste estudo.

Por outro lado, Shabala (2010) refere-se a um processo de formação de aerênquima independente de etileno, baseado no papel da homeostase iônica, onde se propôs um modelo de sinalização ligado ao decréscimo de K^+ citosólico e à morte celular programada (MCP) em condições de estresse por salinidade (SHABALA, 2009; SHABALA et al., 2007). Por esse modelo o Na^+ entra na célula por canais NSCC (canais de cátions não seletivos), causando despolarização da membrana e resultando em um vazamento de K^+ a partir da célula, por meio de canais KOR (canais de retificação externa de K^+ ativados por despolarização) sensíveis à TEA (cloreto de tetraetilamônio). Ao mesmo tempo, a elevação do Ca^{+2} citosólico induzido por salinidade causará aumento nos níveis de EROs resultantes da ativação de NADPH oxidases via mecanismo de feedback positivo; isso causará um efluxo adicional de K^+ via canais NSCC que

resultará em um decréscimo de K^+ citosólico, podendo ativar proteases tipo caspases que levarão à MCP.

Além disso, alguns trabalhos identificaram vários genes cuja expressão está associada à formação de aerênquima em raízes de milho. Rajhi et al. (2011) observaram 575 genes nas células corticais por análise de *microarray*, que foram *up* ou *down* regulados sob condições de alagamento e induzidos ou reprimidos por um pré-tratamento com 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor de percepção de etileno gasoso. Segundo estes autores, os genes diferencialmente expressos incluem os relacionados à geração ou eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs), sinalização de Ca^{+2} , afrouxamento e degradação da parede celular. Além destes genes, Thirunavukkarasu et al. (2013) verificaram que genes envolvidos na síntese de auxina e ativação de proteínas G foram *up* regulados em genótipos de milho tolerantes ao alagamento (linhagem HKI 1105), assim como os genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, à peroxidase e via de fermentação foram coexpressos nestes genótipos.

Mecanismos de formação de aerênquima independentes do etileno foram descritos em casos de deficiência nutricional em raízes de milho (DREW; HE; MORGAN, 1989; HE; MORGAN; DREW, 1992), enquanto o papel de EROs na formação de aerênquima tem sido sugerido por vários estudos (BOURANIS et al., 2003; PARLANTI et al., 2011). Em milho ‘Saracura’ sugere-se que o papel das EROs seja importante na formação de aerênquima, uma vez que estas moléculas já seriam produzidas pelas plantas em resposta à hipoxia, possibilitando uma alternativa viável ao aumento da produção de etileno, como uma estratégia de maior tolerância ao alagamento.

A relação das EROs na formação de aerênquima nas raízes de diferentes ciclos de milho ‘Saracura’ sob alagamento, foi avaliada de modo indireto pela expressão gênica das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD) e

peroxidase do ascorbato (APX) e pela determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Observou-se variação da expressão dos genes entre os ciclos de seleção ao longo do tempo de alagamento (Figura 3). Considerando o ciclo de seleção, a expressão da SOD foi maior em C1, enquanto da APX foi maior em C18. Ao considerar o tempo de alagamento, observou-se aumento da expressão em SOD e APX após um dia, com posterior redução em 7 dias de hipoxia.

Verifica-se que SOD e APX são componentes enzimáticos do sistema antioxidante, que protegem as plantas contra os danos do estresse oxidativo causado pela superprodução de EROs em condições de estresse abiótico (GILL; TUTEJA, 2010). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra níveis elevados de EROs, removendo íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por catalizar sua dismutação em H_2O_2 e O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Considerando o estresse provocado pelo alagamento e a menor tolerância de C1, pode-se inferir que nestas plantas a maior expressão de SOD representou uma resposta de defesa contra os danos provocados pelo $O_2^{\cdot-}$. Campos (2010) observou baixa expressão de SOD em plântulas de milho 'Saracura' dos ciclos 1 e 18 ao longo de 24 horas de alagamento. Isso demonstra que a SOD pode apresentar variações em sua expressão, sintetizando diferentes números de isoformas de acordo com o tecido, espécie e tipo de estresse (GOMES-JÚNIOR et al., 2006; ZANANDREA, 2010).

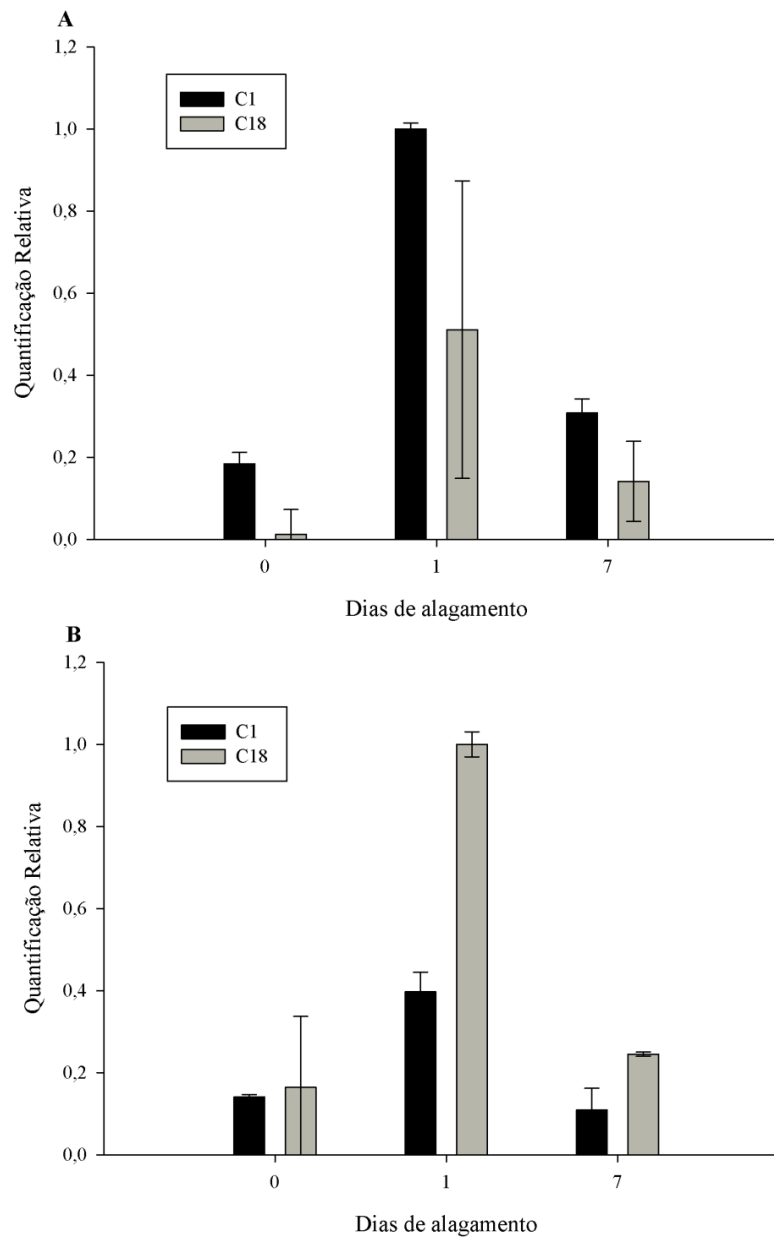


Figura 3 Perfil da expressão relativa quantitativa dos genes SOD4 (A) e cAPX (B) em raízes de milho 'Saracura' ciclo C1 e C18 submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão

A enzima APX desempenha um dos papéis mais importantes na eliminação de EROs e proteção das células vegetais, atuando sobre o H_2O_2 , formando água (GILL; TUTEJA, 2010). A sua maior expressão em C18 pode ser um indício de aumento da produção de H_2O_2 , que, talvez esteja envolvido nos processos de sinalização para formação de aerênquima pela morte celular programada nestas plantas. Por outro lado, a redução de sua atividade aos 7 dias de alagamento, provavelmente, deve-se à menor produção de H_2O_2 , como resultado da redução no número de células do córtex radicular pela formação do aerênquima. Estudos relatam que condições de hipoxia estimulam a produção de H_2O_2 (BLOKHINA; CHIRKOVA; FAGERSTEDT, 2001). De acordo com Blokhina, Virolainen e Fagerstedt (2003), o acetaldeído normalmente acumulado sob essas condições pode funcionar como doador de elétrons e ativar o $O_2^{\cdot-}$ que, ao sofrer dismutação pela ação da SOD, forma H_2O_2 , cujo conteúdo nas células é regulado pela ação da catalase (CAT) e por diversas peroxidases, entre elas a APX. Além disso, estas moléculas podem ser geradas por complexos enzimáticos (APEL; HIRT, 2004).

Como já relatado, outros genes, como os relacionados à geração ou eliminação das EROs, estão envolvidos na formação de aerênquima lisígeno em raízes de milho (RAJHI et al., 2011). Segundo Møller, Jensen e Hansson (2007), as modificações provocadas pelas EROs podem causar danos permanentes que resultam na morte celular programada, formando aerênquima em condições de hipoxia. De outro modo, a formação de aerênquima pode ser estimulada pela via do etileno que, pela indução ao acúmulo de EROs, ativa as enzimas de degradação e afrouxamento da parede celular e desencadeia a morte celular (DREW, 1997; YAMAUCHI et al., 2013).

Pelos resultados encontrados para a variedade 'Saracura', há indícios do papel do H_2O_2 no processo de formação de aerênquima no córtex radicular talvez de modo independente da rota do etileno, principalmente, nos momentos

iniciais de alagamento e na variedade sensível, onde a produção deste hormônio foi menor.

Em relação ao conteúdo de peróxido de hidrogênio (Figura 4), não houve interação entre as variáveis tempo e ciclo de seleção, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. A ausência de variação na produção de H_2O_2 pode ser resultado da redução no número de células corticais das raízes, em função da formação de aerênquima na condição alagada e da possível ação da APX em C1 e C18 após 24 horas de alagamento. Pereira et al. (2010) relacionaram o aumento na proporção de aerênquima no córtex radicular de milho 'Saracura' a uma menor produção de EROs nos ciclos finais de seleção, uma vez que haveria melhor difusão de O_2 pela raiz, o que resultaria em menor produção de H_2O_2 . Além disso, a formação de espaços de ar em decorrência do desenvolvimento de aerênquimas reduziria a quantidade de células e, conseqüentemente, os locais de produção de EROs.

Ao H_2O_2 é atribuído um papel duplo, onde em baixas concentrações atua como uma molécula sinalizadora e em altas concentrações leva à morte celular programada (QUAN et al., 2008). Vários sinais de desenvolvimento ou ambientais podem levar ao acúmulo de H_2O_2 que, por sua vez, desencadeia uma variedade de respostas, agindo como uma molécula sinalizadora que regula o desenvolvimento vegetal, adaptações ao estresse e a morte celular programada. Essa sinalização é mediada por meio de alterações no influxo de Ca^{2+} , alteração redox, ativação de cascatas de proteínas quinases (MPKs), modulação da atividade de proteínas fosfatases e de fatores de transcrição, além de interação com outras moléculas sinalizadoras, como ácido salicílico e óxido nítrico (APEL; HIRT, 2004; CHENG; SONG, 2006; GECHEV; HILLE, 2005; PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Segundo Xu et al. (2013), a formação de aerênquima em raízes de trigo em condições de alagamento foi regulada por EROs, conforme o processo de morte das células corticais. Para estes autores,

após o início do alagamento a redução no nível de oxigênio é sentida pelas raízes, onde a hipoxia regula diferencialmente a expressão dos genes de controle da homeostase de EROs, levando ao acúmulo desses metabólitos em células chamadas pré-aerenquimatosas, onde tem início eventos de morte celular, embora a forma destas células permaneça intacta. O contínuo acúmulo de EROs, principalmente, nas células corticais induz a lise nas células pré-aerenquimatosas e suas subjacentes, resultando na formação dos espaços de ar. Embora os detalhes destes mecanismos ainda precisem ser estudados, é possível inferir que em 'Saracura' a formação de aerênquima pode ter sido estimulada pela morte celular programada, relacionada diretamente a sinalização conferida pelas moléculas de H_2O_2 , produzidas em resposta à deficiência de oxigênio, principalmente em BR 107 e nos momentos iniciais de alagamento, onde a produção de etileno foi reduzida.

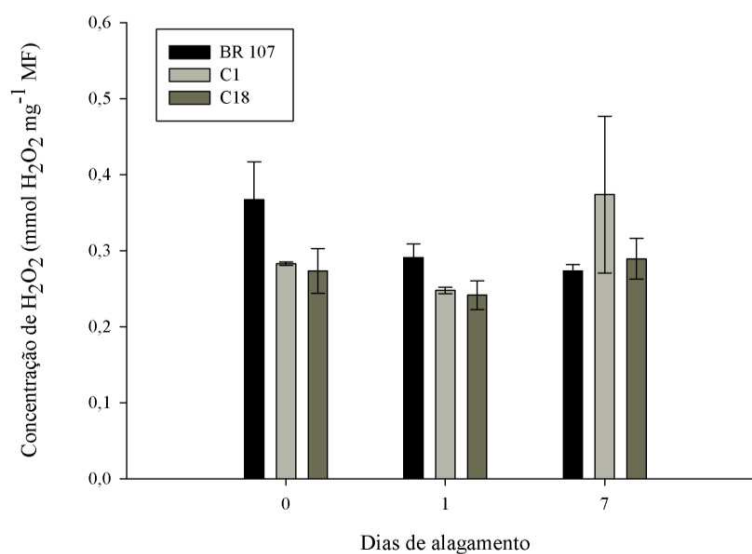


Figura 4 Conteúdo de peróxido de hidrogênio em raízes de milho 'Saracura' ciclos C1 e C18 e variedade sensível BR 107 submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão

O processo de degradação enzimática da parede celular para formação do aerênquima foi avaliado pela atividade da celulase e da poligalacturonase (PG), ao longo do período de alagamento nos diferentes ciclos de seleção.

A atividade da celulase (Figura 5) apresentou interação entre as variáveis tempo de alagamento e ciclo de seleção, com aumento considerável em C1 e C18 aos 7 dias. Estes resultados são semelhantes aos observados por Dantas, Aragão e Alves (2001), onde a atividade da celulase em coleóptilos e raízes de milho ‘Saracura’ sofreu um decréscimo nos primeiros dias de alagamento em razão do estresse, aumentando em seguida. De acordo com He et al. (1996), a celulase 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. Para estes autores, a atividade máxima da celulase em raízes de milho coincide com a formação de aerênquima, sendo totalmente perdida após a completa degradação da parede celular. Porém, a participação de outras enzimas degradativas de parede celular em estádios iniciais deste processo é necessária, permitindo o acesso de enzimas degradativas ao conteúdo da parede, levando a lise celular (BRAGINA; RODIONOVA; GRINIEVA, 2003; SOUZA, 2010).

Em relação à PG, observou-se pouca modificação na atividade enzimática (Figura 5), não havendo interação entre as variáveis tempo e ciclo de seleção. Porto et al. (2013), estudando mesocótilos de milho Saracura C18 sob hipoxia, relataram redução na atividade da PG após alagamento. Essa menor atividade da PG poderia ser em virtude de sua inacessibilidade à célula (PORTO et al., 2013; SELING et al., 2000), o que poderia explicar o comportamento observado nas raízes de milho ‘Saracura’. Contudo, considerando o aumento na formação de aerênquima observado neste estudo, infere-se que a atividade apresentada pela PG foi suficiente para permitir a degradação da parede das células, pela ação sobre pectinas (KAYSHAP et al., 2001).

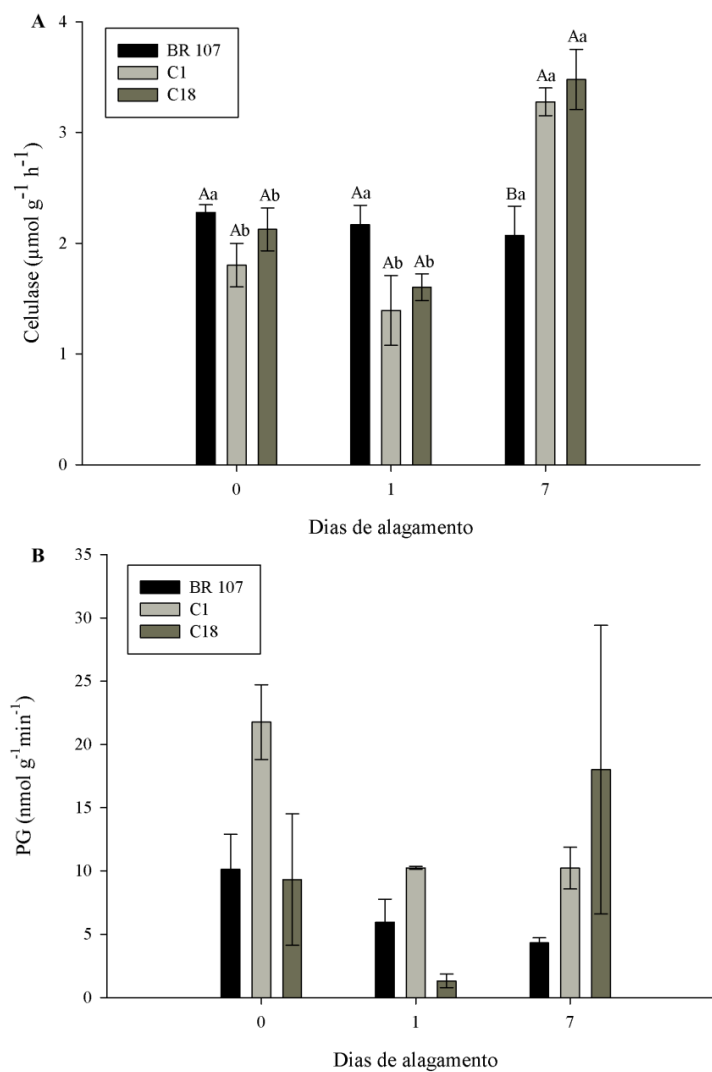


Figura 5

Atividade enzimática da celulase (A) e poligalacturonase (PG) em raízes de milho ‘Saracura’ ciclo de seleção C1 e C18 e variedade sensível BR 107 submetidas ao alagamento. As barras indicam o erro padrão. As letras maiúsculas comparam as médias dos ciclos de seleção dentro de cada tempo, enquanto as letras minúsculas comparam o tempo de alagamento em cada ciclo de seleção com base no Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

As características anatômicas relacionadas à formação de aerênquimas em raízes dos ciclos de seleção do milho ‘Saracura’ foram analisadas ao longo do tempo de alagamento. A proporção de aerênquima no córtex radicular diferiu entre os ciclos de seleção de um modo geral, apresentando aumento ao longo do tempo de alagamento, exceto em C1, com interação significativa entre as variáveis (Tabela 2 e Figura 6). Esse aumento foi evidente, principalmente, em C18.

As variações observadas na proporção de aerênquima entre os ciclos de seleção podem ser relacionadas às oscilações na taxa de formação de aerênquima (TFA), que foi obtida a partir do segundo dia de avaliação.

Tabela 2 Proporção (%) de área ocupada por aerênquima em relação à área total do córtex radicular de ciclos de seleção de milho ‘Saracura’ submetidos ao alagamento

Ciclos de seleção	Dias de alagamento					Média
	0	1	3	5	7	
BR 107	0,31 Ab	08,24 Ab	13,01 Ba	17,00 Aa	22,21 Ba	12,15 B
C1	0,57 Aa	07,54 Aa	06,65 Ba	14,80 Aa	06,34 Ca	07,18 C
C5	0,42 Ab	10,32 Aa	19,70 Aa	11,82 Aa	15,74 Ba	11,60 B
C11	0,50 Ab	14,40 Aa	11,88 Ba	17,57 Aa	15,38 Ba	11,95 B
C18	0,45 Ad	14,96 Ac	25,77 Ab	11,71 Ac	42,79 Aa	19,14 A
Média	0,45 c	11,09 b	15,40 b	14,58 b	20,49 a	

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

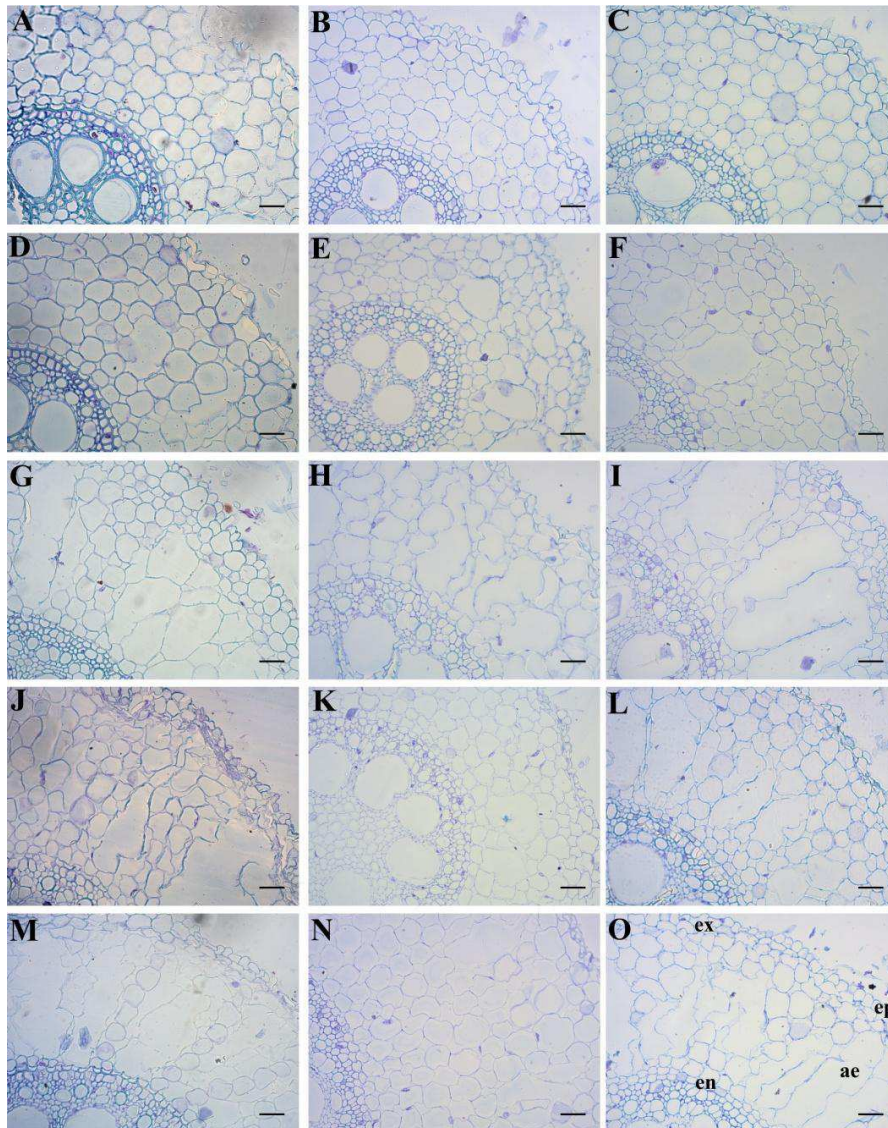


Figura 6 Secções transversais de raízes de milho evidenciando a proporção de aerênquima no córtex e a espessura da epiderme, exoderme e endoderme. Variedade sensível BR 107 (A, D, G, J, M) e Ciclos de seleção de milho 'Saracura' C1 (B, E, H, K, N) e C18 (C, F, I, L, O), submetidas a 0 (A-C), 1 (D-F), 3 (G-I), 5 (J-L) e 7 (M-O) dias de alagamento. ae= aerênquima, en= endoderme, ep= epiderme, ex= exoderme. Barras = 50µm

Os resultados de TFA (Figura 7) demonstraram que a maior taxa de formação ocorreu logo nas primeiras 24 horas de alagamento em todas as plantas analisadas, com destaque para C11 e C18, ciclos com maior potencial de tolerância. Em seguida, a TFA apresentou redução em todas as plantas, com posterior pequeno aumento em C1 e C11 no 5º dia. No 7º dia de alagamento, a taxa permaneceu menor em todas as plantas, com exceção de C18, onde a TFA voltou aos valores do início do alagamento. Considerando C1 e C18, o maior incremento na TFA com um dia de alagamento coincide com a maior expressão de APX, fornecendo indícios do envolvimento do H₂O₂ nesse processo. Além disso, o pico de produção de etileno em C18 também foi evidente nesse período, demonstrando que o hormônio pode ser relacionado à indução de aerênquima nesse ciclo mais tolerante. Por outro lado, o aumento na TFA em C18 aos 7 dias pode ser decorrente de maior sensibilidade das células ao etileno (HE; MORGAN; DREW, 1992), como uma resposta de maior tolerância ao alagamento.

Pereira et al. (2008, 2010) e Souza et al. (2009) verificaram aumento na proporção de aerênquima encontrado no córtex radicular do milho ‘Saracura’ em relação ao grupo controle e aos ciclos anteriores de seleção, com maior capacidade de desenvolver aerênquima nos últimos ciclos de seleção. Diferenças no tempo de exposição ao alagamento, na fase de desenvolvimento das plantas e nas condições experimentais entre estes trabalhos e o presente estudo devem ser consideradas ao analisar os resultados. No entanto, o maior desenvolvimento de aerênquima nas raízes do milho ‘Saracura’ foi uma resposta comum entre os estudos. Com isso, essa cultivar pode apresentar maior capacidade de crescimento e sobrevivência por períodos de tempo maiores sob alagamento que outras cultivares (PEREIRA et al., 2010), uma vez que a formação de aerênquima possibilita o transporte de oxigênio da parte aérea até as raízes e,

assim, a oxigenação dos tecidos e a manutenção do metabolismo aeróbico na raiz (ARMSTRONG, 1979; EVANS, 2003).

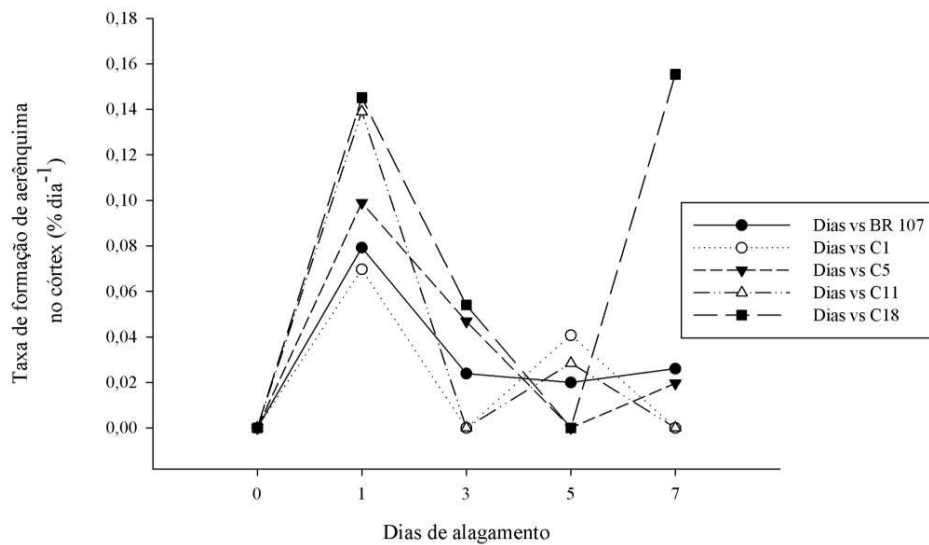


Figura 7 Taxa de formação de aerênquima em raízes de ciclos de seleção de milho Saracura em relação ao tempo de alagamento

Também se observou pelas análises anatômicas um aumento na área do córtex radicular (Tabela 3 e Figura 6), ao longo do tempo de alagamento, visto que entre as plantas, C11, C18 e a variedade sensível apresentaram as maiores áreas. Isso pode possibilitar uma maior disponibilidade de área para a formação de aerênquima, além de resultar em maior espessura total da raiz (Figura 10). Resultados semelhantes foram observados por Ferrer et al. (2004) em milho ‘Saracura’ ciclo 14, com aumento da espessura do córtex e na proporção de aerênquima em condições de alagamento.

Tabela 3 Área total (mm²) do córtex radicular de ciclos de seleção de milho ‘Saracura’ submetidos ao alagamento por 7 dias

Ciclos de seleção	Dias de alagamento					Média
	0	1	3	5	7	
BR 107	0,81 Ab	0,74 Ab	0,85 Cb	1,23 Aa	1,39 Aa	1,00 A
C1	0,43 Bc	0,47 Bc	0,61 Db	0,64 Cb	1,44 Aa	0,72 B
C5	0,61 Bc	0,51 Bc	0,36 Ed	0,76 Cb	0,96 Ba	0,64 C
C11	0,52 Bd	0,55 Bd	1,16 Bb	0,92 Bc	1,47 Aa	0,92 A
C18	0,60 Bc	0,64 Ac	1,37 Aa	1,186 Ab	1,11 Bb	0,98 A
Média	0,60 d	0,58 d	0,87 c	0,95 b	1,27 a	

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Além do desenvolvimento de aerênquima, outras modificações anatômicas podem contribuir na tolerância à hipoxia, prevenindo a perda de oxigênio pelas raízes. Estas modificações incluem as barreiras à perda radial de oxigênio (ROL) nas zonas basais das raízes, caracterizadas pela deposição de lignina e suberina nas camadas externas, como epiderme e exoderme (COLMER, 2003; COLMER; VOESENEK, 2009). Em adição ao aerênquima, estas barreiras podem promover a difusão longitudinal de oxigênio em direção ao ápice radicular, além de impedir a entrada de compostos potencialmente tóxicos (ARMSTRONG, 1979; COLMER, 2003; COLMER; VOESENEK, 2009).

Nesse contexto, a espessura da epiderme, exoderme e endoderme foi analisada em milho ‘Saracura’ (Tabela 4 e Figura 6). Os resultados demonstraram modificações, com interação significativa entre as variáveis tempo de alagamento e ciclo de seleção. Não houve variação na espessura da epiderme, enquanto houve redução na espessura da exoderme e aumento na espessura da endoderme nas raízes expostas aos maiores períodos de

alagamento. Em relação ao ciclo de seleção, a epiderme foi menor em C1 e C18; enquanto a exoderme e a endoderme foram menores apenas em C1. Por outro lado, considerando os sucessivos ciclos de seleção, Souza et al. (2009) observaram, nos ciclos finais, aumento na espessura da epiderme, redução na camada de células suberizadas presentes na região de hipoderme (exoderme) e nenhuma modificação na endoderme das raízes submetidas ao alagamento.

A epiderme é o primeiro tecido a demonstrar os sintomas de estresse (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Assim, as reduzidas modificações observadas na epiderme radicular do milho 'Saracura' podem indicar uma resposta de resistência desse tecido, conferindo maior tolerância ao alagamento por dificultar a entrada de compostos tóxicos na raiz.

A presença de uma camada espessa de exoderme no início do alagamento pode evitar a perda de oxigênio para a rizosfera e a absorção de fitotoxinas em plantas, quando o desenvolvimento de aerênquimas ainda é reduzido. Além disso, segundo Pereira et al. (2008) e Souza et al. (2009), a presença dessa camada espessa pode diminuir a liberação de etileno e metano acumulados e afetar a absorção e refluxo de água. Por outro lado, a menor espessura dessa camada nas raízes expostas ao maior tempo de alagamento pode diminuir a resistência ao fluxo de água para o cilindro vascular, favorecendo a manutenção da condutividade hidráulica em raízes com maior proporção de aerênquima (PEREIRA et al., 2008). Aliado a isso, uma fina camada de exoderme pode permitir maior difusão de O₂, criando uma rizosfera aeróbica, sem, no entanto, causar perdas prejudiciais para o córtex, em decorrência da elevada formação de aerênquima (SOUZA et al., 2009) ao longo do tempo.

Tabela 4 Espessura da exoderme, epiderme e endoderme de raízes de ciclos de seleção de milho Saracura submetidos ao alagamento

Ciclos de seleção	Dias de alagamento					Média
	0	1	3	5	7	
Exoderme (μm)						
BR 107	27,63 Aa	27,80 Aa	25,33 Aa	24,56 Aa	20,77 Aa	25,22 A
C1	15,19 Ba	16,65 Ba	17,16 Ba	18,25 Aa	18,46 Aa	17,14 B
C5	27,73 Aa	22,72 Ba	25,73 Aa	18,32 Ab	16,68 Ab	22,24 A
C11	26,97 Aa	20,41 Bb	27,43 Aa	20,99 Ab	21,90 Ab	23,54 A
C18	20,16 Bb	31,20 Aa	23,42 Ab	17,53 Ab	18,84 Ab	22,23 A
Média	23,54 a	23,75 a	23,81 a	19,93 b	19,33 b	
Epiderme (μm)						
BR 107	15,40 Bb	18,55 Aa	15,73 Cb	18,88 Aa	16,43 Ab	17,00 A
C1	18,21 Aa	13,50 Bb	12,74 Cb	15,42 Bb	14,77 Ab	14,92 B
C5	17,15 Ab	20,21 Aa	20,59 Aa	14,49 Bc	17,76 Ab	18,04 A
C11	18,94 Aa	15,02 Bb	17,33 Bb	20,80 Aa	15,10 Ab	17,44 A
C18	14,76 Ba	17,39 Aa	14,28 Ca	15,77 Ba	14,71 Aa	15,38 B
Média	16,89 a	16,93 a	16,14 a	17,07 a	15,75 a	
Endoderme (μm)						
BR 107	10,82 Ab	12,04 Ab	10,71 Cb	13,73 Aa	13,11 Ba	12,09 A
C1	08,82 Bc	09,90 Bc	09,16 Cc	11,51 Bb	15,04 Aa	10,87 B
C5	11,37 Ab	09,62 Bc	12,01 Bb	15,10 Aa	14,00 Ba	12,42 A
C11	09,35 Bc	10,53 Bc	13,53 Ab	15,22 Aa	16,59 Aa	13,04 A
C18	08,45 Bb	12,28 Aa	14,50 Aa	12,25 Ba	13,10 Ba	12,12 A
Média	09,76 d	10,88 c	11,98 b	13,56 a	14,37 a	

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Além da espessura da exoderme, modificações na deposição de suberina e lignina nas paredes dessas células podem ocorrer. Segundo Watanabe et al. (2013), o processo de suberização das camadas externas da raiz é induzido por diferentes fatores, como deficiência de oxigênio em solos alagados. Na ausência de suberina, a parede celular possui pares de pontoações que permitem a passagem de água e gases entre a planta e o ambiente. Com a deposição de suberina e lignina há redução no diâmetro destas pontoações e fortalecimento das barreiras apoplásticas (HOSE et al., 2001; WATANABE et al., 2013). Esse processo pode ter ocorrido neste estudo e associado ao aumento da espessura da parede celular, poderia representar uma estratégia de tolerância do milho ‘Saracura’ às condições de alagamento (Figura 8). No entanto, estudos que comprovem a presença dessa deposição e sua relação com a tolerância da cultivar ainda precisam ser realizados.

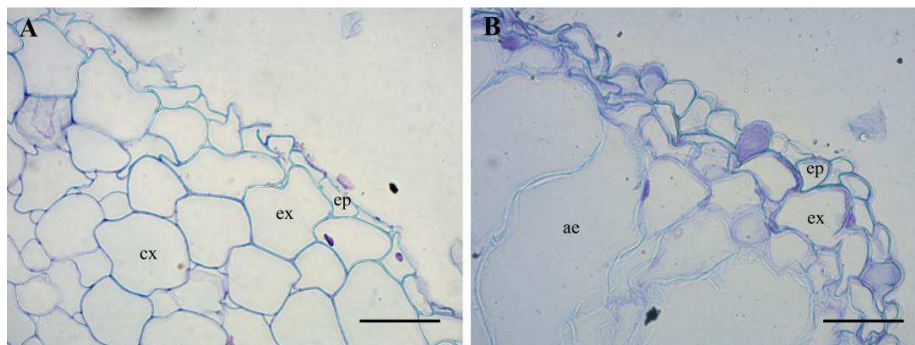


Figura 8 Detalhe da camada de exoderme de raízes de milho Saracura ciclo C18, não alagadas (A) e alagadas por 7 dias (B). ae= aerenquima, cx= córtex, ep= epiderme, ex= exoderme. Barras = 50 μ m

Em relação à endoderme, o aumento da espessura nas plantas expostas a maior tempo de alagamento pode ser uma resposta compensatória ao comportamento observado para a exoderme, por também atuar como uma

barreira apoplástica (ENSTONE; PETERSON; MA, 2003). Além disso, a endoderme pode prevenir o efluxo de íons do apoplasto do estelo para o apoplasto do córtex, causado em situações de baixo ou nenhum fluxo transpiratório, que leva a uma lenta remoção de íons para a parte aérea (ENSTONE; PETERSON; MA, 2003). Assim, nas plantas de milho ‘Saracura’ uma possível baixa taxa transpiratória em função do alagamento pode estar relacionada a essa resposta da endoderme. Neste estudo, a taxa transpiratória não foi avaliada, entretanto Souza et al. (2011) observaram redução da transpiração em plantas de milho Saracura no estágio de florescimento submetidas ao alagamento. De maneira semelhante, outros estudos também relataram redução na transpiração em plantas de milho submetidas à deficiência de oxigênio (LONE; WARSI, 2009; WANG et al., 2012; YORDANOVA; POPOVA, 2007).

Ainda, sobre a endoderme, foi possível verificar em secções transversais próximas ao ápice radicular (Figura 9 e 11) a diferenciação da camada de endoderme, juntamente com o desenvolvimento dos vasos de xilema. De acordo com Enstone, Peterson e Ma (2003), na maioria das plantas, Estrias de Caspary se diferenciam dentro de 10 mm a partir do ápice radicular. Neste estudo, nas secções a cerca de 3 a 4 mm da junção coifa raiz observou-se a diferenciação da endoderme de forma distinta entre as raízes de BR 107 e C18, alagadas e não alagadas (Figura 9). De um modo geral, a diferenciação da endoderme, assim como dos elementos de vasos, foi mais evidente nas raízes alagadas. Independente da condição experimental a endoderme diferenciou-se mais rapidamente em C18, em comparação à BR 107. Com isso, constata-se que, em resposta ao alagamento, pode ocorrer tanto o aumento da espessura da camada de endoderme nas raízes de milho ‘Saracura’, como a diferenciação mais rápida desta camada no ápice radicular, como possível estratégia de tolerância.

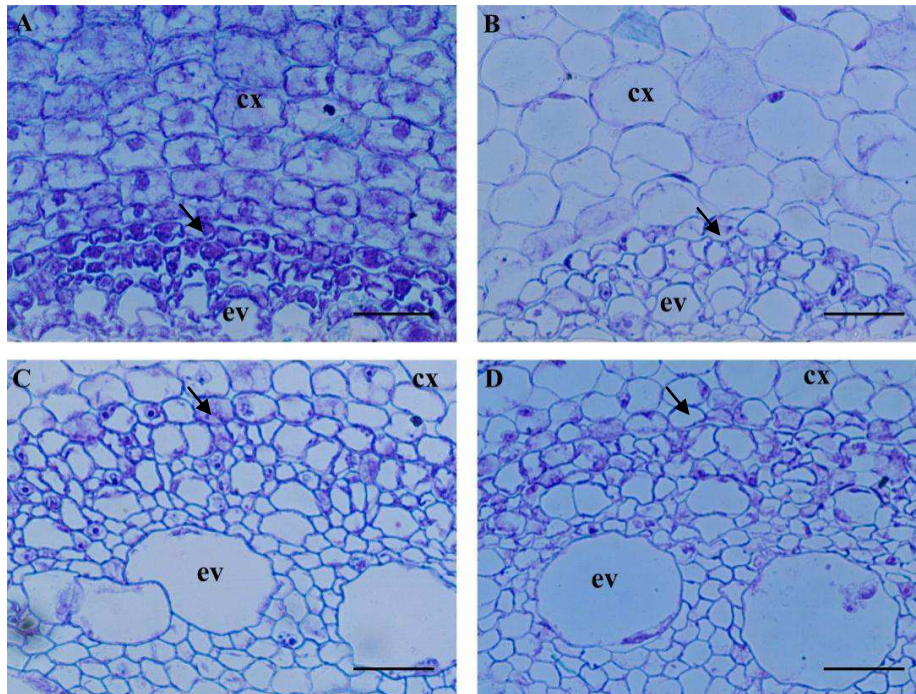


Figura 9 Detalhe da diferenciação da endoderme em secções transversais do ápice de raízes de milho variedade sensível BR 107 (A e C) e ciclo de seleção C18 (B e D), não alagadas (A e B) e alagadas por 7 dias (C e D). Secções a 4 mm (A e B) e 3 mm (C e D) da região de junção coifa meristema apical. Cx= córtex, ev= elemento de vaso. Seta indica a endoderme. Barras = 50 μ m

O ápice radicular de plantas submetidas ao alagamento pode apresentar modificações, em função da deficiência de oxigênio, como a morte celular programada e necrose (SUBBAIAH; SACHS, 2003). De acordo com estes autores, estas regiões são compostas de tecidos compactos, com pouco ou nenhum espaço intercelular que restringem a difusão de gases. Consequentemente, sob alagamento os ápices das raízes podem morrer em função da deficiência de O₂. Entretanto, as análises anatômicas do ápice radicular de milho ‘Saracura’ (Figura 11, 12 e 13) demonstraram a presença de espaços intercelulares na região de meristema fundamental, com modificações

em relação à quantidade e tamanho, em função do ciclo de seleção e tempo de alagamento. Além disso, secções transversais realizadas nestas mesmas regiões (entre 3 a 7 mm de distância da junção coifa meristema apical) comprovaram o início da formação de espaços intercelulares de origem, provavelmente, esquizógena (Figura 11 e 13). Isso, uma vez que não foram observados indícios de fragmentos celulares resultantes de necrose ou morte celular programada.

Purnobasuki e Suzuki (2005) observaram o início de formação dos espaços intercelulares em raízes de *Avicennia marina* a partir de 0,2mm da junção coifa raiz. A partir de 6 mm, os autores constataram clara separação das células. De um modo geral, nos ciclos de seleção de milho ‘Saracura’ após 7 dias de alagamento, observou-se a presença de espaços intercelulares a cerca de 0,15mm da junção coifa meristema apical. Assim, como em *A. marina*, em secção longitudinal do ápice radicular de milho foi possível verificar espaços intercelulares longitudinais formando colunas ao longo do córtex, sem aparente dissolução das células, mas expansão radial e longitudinal como em um processo esquizógeno (Figura 12). Nos primeiros dias de avaliação estes espaços próximos à ponta da raiz não foram observados (Figura 11).

Em relação à posição de início de formação de aerênquima em raízes de milho, há informações contraditórias na literatura sobre a distância do ápice radicular. He, Drew e Morgan (1994) relataram o início da formação de aerênquima 10 mm após a ponta da raiz, enquanto Bouranis et al. (2003) encontraram canais de ar a 2 mm do ápice, onde aerênquima se desenvolveram em resposta à deficiência nutricional. Por outro lado, Gunawardena et al. (2001) avaliaram a formação de aerênquimas a 10 mm do ápice.

De acordo com Drew (1997), mesmo raízes contendo aerênquima há certa limitação na condução de O_2 por longas distâncias, até a região apical. Com isso, no caso do milho ‘Saracura’, a formação de espaços intercelulares na região meristemática das raízes, onde, normalmente, há alto consumo de O_2 ,

pode caracterizar uma resposta ao alagamento, bem como uma possível ineficiência nas barreiras a perda radial de O₂. No entanto, estudos complementares devem ser realizados com a finalidade de investigar a formação destes espaços e seus efeitos sobre o funcionamento do meristema radicular e na tolerância da cultivar à hipoxia.

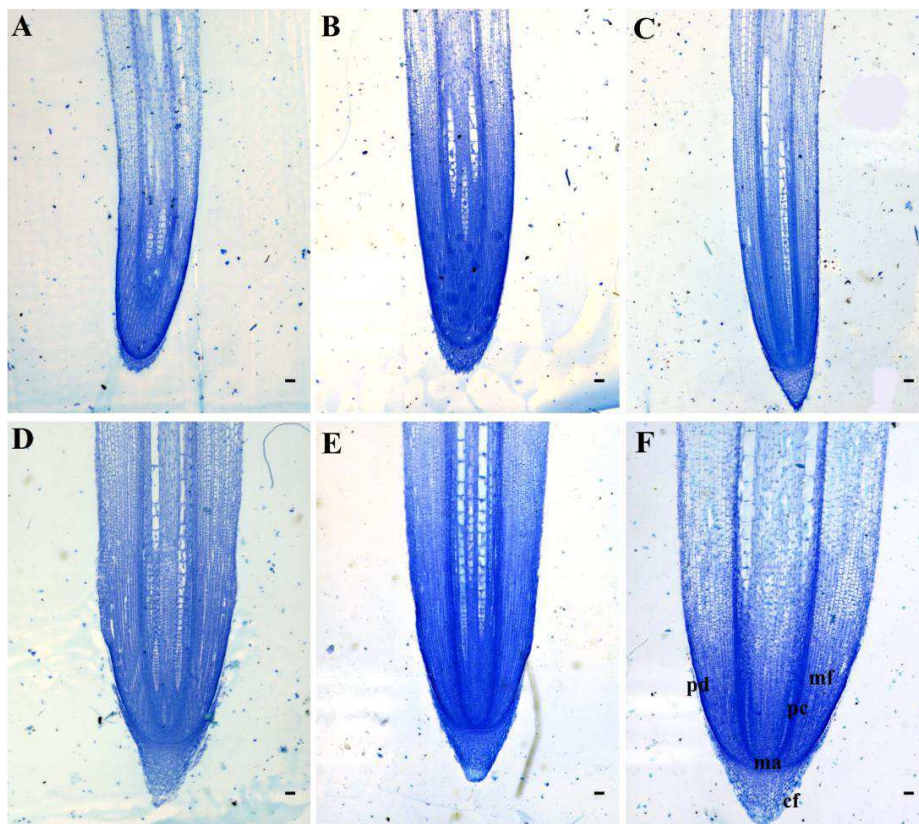


Figura 10 Secções longitudinais do ápice de raízes de milho, evidenciando variações na espessura da raiz. Variedade sensível BR 107 (A, D) e Ciclos de seleção de milho Saracura C1 (B, E) e C18 (C, F), submetidas a 1 (A-C) e 7 (D-F) dias de alagamento. Barras = 100 μ m

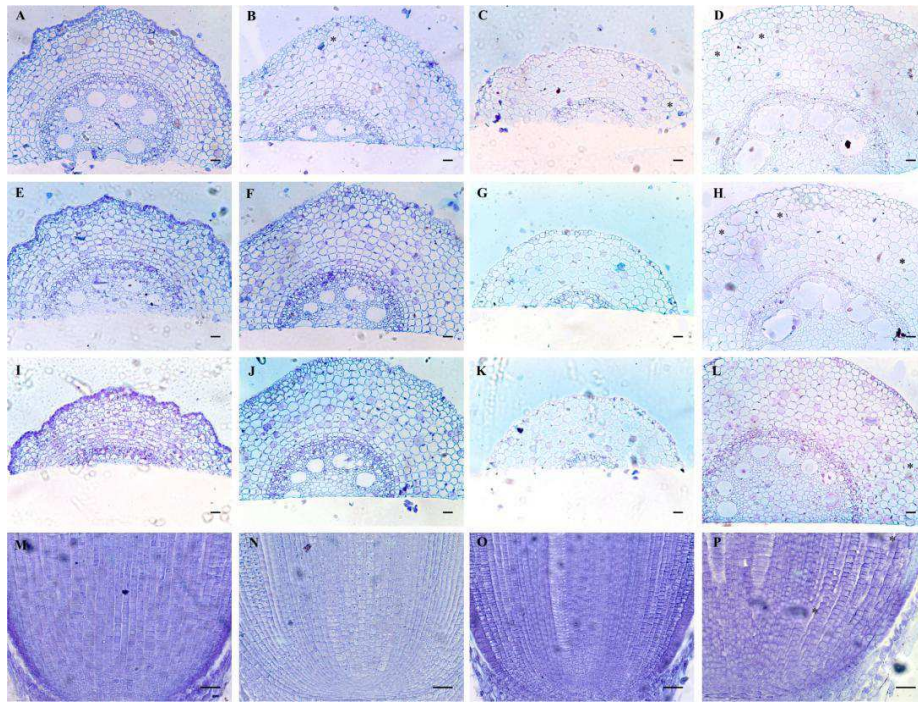


Figura 11 Secções transversais (A-L) e longitudinais (M-P) do ápice de raízes de milho, evidenciando os espaços intercelulares na região meristemática. Variedade sensível BR 107 (A, B, E, F, I, J, M, N) e Ciclos de seleção de milho Saracura C18 (C, D, G, H, K, L, O, P), submetidas a 0 (A, E, I, M, C, G, K, O) e 7 (B, F, J, N, D, H, L, P) dias de alongamento. Secções foram feitas a 3mm (J, L), 4mm (I, K), entre 3 e 7mm (B, F, D, H), entre 4 e 6mm (A, E, C, G) da região de junção coifa meristema apical. Barras = 50 μ m. * Formação de espaços entre as células

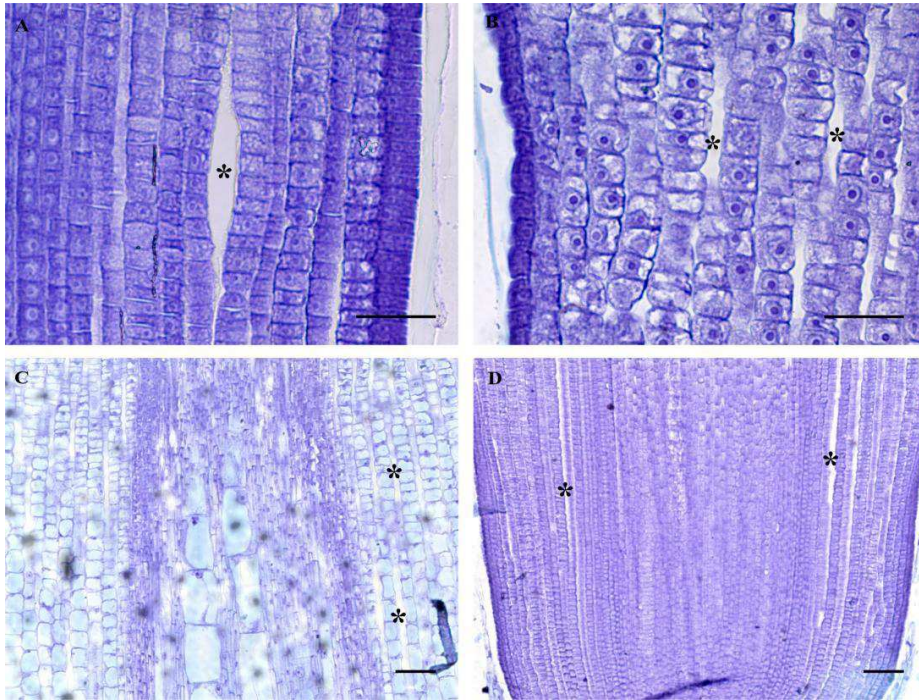


Figura 12 Secções longitudinais do ápice de raízes de milho, evidenciando os espaços intercelulares na região meristemática. Detalhes dos espaços intercelulares no Ciclo de seleção de milho Saracura C18 submetidas a 7 dias de alongamento. Barras = 50 μ m. * Formação de espaços entre as células

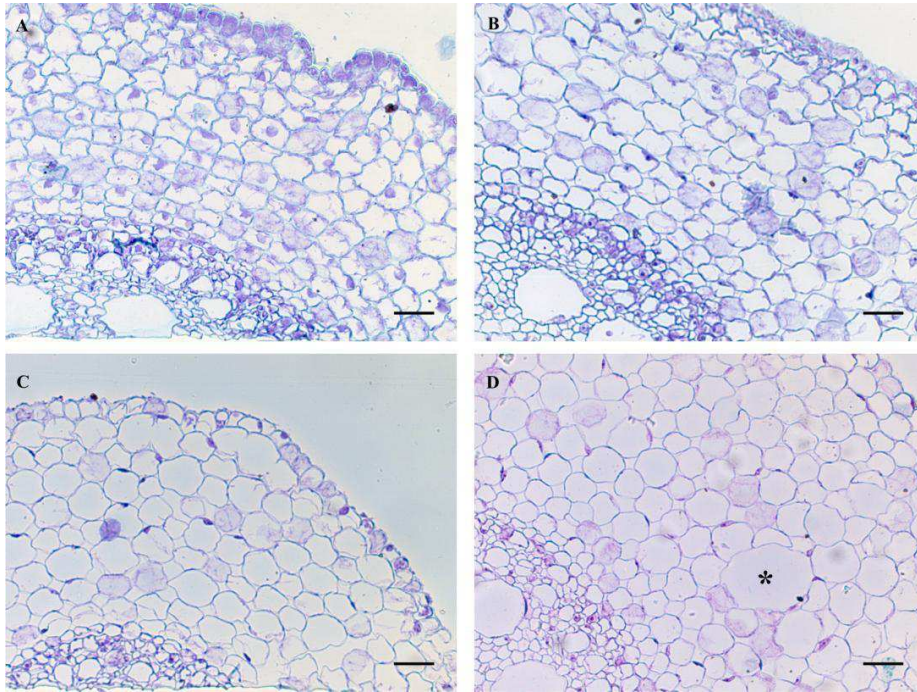


Figura 13 Secções transversais do ápice de raízes de milho variedade sensível BR 107 (A e B) e ciclo de seleção C18 (C e D), evidenciando os espaços intercelulares na região meristemática e a diferenciação da endoderme. Raízes não alagadas (A e C) e alagadas (B e D). Detalhes dos espaços intercelulares a 4mm (A e C) e 3mm (B e D) da região de junção coifa meristema apical. Barras = 50 μ m. * Formação de espaços entre as células

5 CONCLUSÃO

Os resultados observados neste estudo demonstram que o tempo de alagamento e o ciclo de seleção genética influenciam os mecanismos de formação de aerênquima em milho ‘Saracura’.

A atividade de ACO e a produção de etileno variam entre os ciclos de seleção, com envolvimento deste hormônio na formação do aerênquima, de modo mais evidente em C18. Associado a isso, a expressão gênica da APX indica que o H_2O_2 também está envolvido no processo de formação lisígena de aerênquima, principalmente, em C18.

Além disso, a formação de espaços intercelulares na região de meristema fundamental e modificações na diferenciação da endoderme no ápice radicular podem ser indícios de resposta ao alagamento nos ciclos mais tolerantes.

Portanto, o nível de tolerância do ciclo de seleção está relacionado ao comportamento do etileno e H_2O_2 na via de sinalização para indução de aerênquima lisígeno em milho ‘Saracura’.

REFERÊNCIAS

- ABIKO, T. et al. Screening of candidate genes associated with constitutive aerenchyma formation in adventitious roots of the teosinte *Zea nicaraguensis*. **Plant Root**, Toyama, v. 6, p. 19-27, 2012.
- 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, p. 33-40, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373–99, 2004.
- ARIKADO, H.; ADACHI, Y. Anatomical and ecological responses of barley and some forage crops to the flooding treatment. **Bulletin Faculty Agriculture**, Tsu, v. 11, p. 1–29, 1955.
- ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Phragmites die-back: effects of propionic, butyric and caproic acids in relation to pH. **New Phytologist**, Cambridge, v. 142, p. 201–217, 1999.
- ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances Botanical Research**, Oxford, v. 7, p. 225-332, 1979.
- ARMSTRONG, W. et al. Oxygen Distribution in wetland plant roots and permeability barriers to Gas-exchange with the Rhizosphere: a Microelectrode and Modelling Study with *Phragmites australis*. **Annals of Botany**, London, v. 86, p. 687-703, 2000.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, p. 391-396, 2006.
- ASHARAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, p. 199–238, 2010.
- ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving views of pectin biosynthesis. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 64, p. 747–79, 2013.

BABU, Y.; BAYER, M. Plant Polygalacturonases involved in cell elongation and separation: the same but different? **The Plants Journal**, London, v. 3, p. 613-623, 2014.

BAILEY-SERRES, J.; COLMER, T. D. Plant tolerance of flooding stress – recent advances. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 37, p. 2211–2215, 2014.

BAILEY-SERRES, J. et al. Making sense of low oxygen sensing. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 129-138, 2012.

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, 2008.

BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 489–494, 2010.

BARBOSA, M. R. et al. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARTLETT, R. R.; JAMES, B. R. Redox chemistry of soils. In: SPARKS, D. A. (Ed.). **Advances in agronomy**. San Diego: Academic, 1993. p. 151-208.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 42 p.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science, 2010. p. 1-30.

BLOKHINA, O. B.; CHIRKOVA, T. V.; FAGERSTEDT, K. V. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1179–1190, 2001.

BLOKHINA, O. B.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 179–194, 2003.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1–18, 2000.

BOURANIS, D. L. et al. Aerenchyma formation in roots of maize during sulphate starvation. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 382–391, 2003.

BRAGINA, T. V.; RODIONOVA, N. A.; 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, 2003.

BRITSCH, L.; GRISEBACH, H. Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. **European Journal of Biochemistry**, Dublin, v. 156, p. 569–577, 1986.

CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A.; ZONTA, E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 171–9, 1999.

CAMPOS, N. A. **Expressão gênica associada à formação de aerênquimas em raízes de milho saracura BRS 4154 sob hipoxia**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

CHENG, Y.; SONG, C. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells. **Science China Life Sciences**, Cham, v. 49, p. 1–11, 2006.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 133–139, 2009.

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**, Dordrecht, v. 26, p. 17–36, 2003.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: quarto levantamento**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature**, London, v. 6, p. 850-861, 2005.

CYRNE, L. et al. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 34, p. 385-393, 2003.

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 Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 251-257, 2001.

DAT, J. F. et al. Sensing and signalling during plant flooding. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 273–282, 2004.

DONG, C. H. et al. Molecular association of the *Arabidopsis* ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, p. 40706–40713, 2010.

D'ONOFRIO, D. J.; ABEL, D. L. Redundancy of the genetic code enables translational Pausing. **Frontiers in Plants Science**, Lausanne, v. 5, n. 140, p. 1-16, 2014.

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**, Bethesda, v. 91, p. 266-271, 1989.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 3, 2000.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. **Annual Review of Plant Physiology, Plant Molecular Biology**, Bethesda, v. 48, p. 223–250, 1997.

DUGARDEYN, J.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. **Plant Science**, Limerick, v. 175, p. 59–70, 2008.

- ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 667–675, 1995.
- EMONS, A. M. C.; MULDER, B. M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science Perspective**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 35-40, 2000.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo. **Características agronômicas das cultivares de milho disponíveis no mercado na safra 2013/2014**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: 16 jan. 2015.
- ENGLISH, P. J. et al. Increased 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase Activity in Shoots of Flooded Tomato Plants Raises Ethylene Production to Physiologically Active Levels. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, p. 1435-1440, 1995.
- ENSTONE, D. E.; PETERSON, C. A.; MA, F. root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, p. 335–351, 2003.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2nd ed. [S. l.: s. n.], 1977. 576 p.
- EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, p. 35–49, 2003.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FERNÁNDEZ, M. D. Changes in photosynthesis and fluorescence in response to flooding in emerged and submerged leaves of *Pouteria orinocoensis*. **Photosynthetica**, Prague, v. 44, p. 32–38. 2006.
- FERNANDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S. F. Extraction and Partial Characterization of the Ethylene-Forming Enzyme from Apple Fruit. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 99, p. 751-754, 1992.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.0**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2007.

FERREIRA J. L.; MAGALHÃES P. C.; BORÉM A. Evaluation of three physiologic characteristics in four cycles of selection in maize cultivar BRS-4154 under tolerance to waterlogging of the soil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1719–1723, 2008.

FERRER, J. L. R. et al. Efeito do cálcio sobre as características anatômicas de raízes de milho (*Zea mays* L.) ‘Saracura’ BRS-4154 submetido ao alagamento em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 172-181, 2004.

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. 56 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, 2007.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Dordrecht, v. 28, p. 1056–1071, 2005.

GALLIE, D. R.; YOUNG, T. E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 271, p. 267–281, 2004.

GAMBRELL, R. P.; DELAUNE, R. D.; PATRICK JÚNIOR, W. H. Redox processes in soils following oxygen depletion, plant life under oxygen deprivation. In: JACKSON, M. B.; DAVIES, D. D.; LAMBERS, H. (Ed.). **Ecology, physiology and biochemistry**. The Hague: SPB, 1991. p. 101–117.

GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 168, n. 1, p. 17–20, 2005.

GEISLER-LEE, J.; CALDWELL, C.; GALLIE, D. R. Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 61, p. 857–871, 2010.

GIBBS, J.; GREENWAY, H. Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 30, p. 1–47, 2003.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOMES-JUNIOR, R. A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GREENWAY, H.; ARMSTRONG, W.; COLMER, T. D. Conditions leading to high CO₂ (>5 kPa) in waterlogged-flooded soils and possible effects on root growth and metabolism. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 9-32, 2006.

GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Ethylene and flooding stress in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 39, n. 1, p. 1–9, 2001.

GRIERSON, D. Manipulation of fruit ripening by genetic modification. **Transgenic Plant Research**, Durham, v. 32, n. 3, p. 109-124, 1998.

GUNAWARDENA, A. H. L. A. N. 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, p. 205–214, 2001.

HARDIN, S. C. et al. Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, London, v. 422, p. 305–312, 2009.

HATSUGAI, N. et al. A cellular suicide strategy of plants: Vacuole-mediated cell death. **Apoptosis**, Bethesda, v. 11, p. 905–911, 2006.

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**, Bethesda, v. 105, p. 861–865, 1994.

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

HE, C. J.; MORGAN, P. W.; DREW, M. C. Enhanced Sensitivity to Ethylene in Nitrogen- or Phosphate-Starved Roots of *Zea mays* L. during Aerenchyma Formation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 98, p. 137-142, 1992.

HE, C. J.; MORGAN, P. W.; DREW, M. C. 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**, Bethesda, v. 112, p. 463–472, 1996.

HOLBROOK, N. M.; ZWIENIECKI, M. A. Plant biology: water gate. **Nature**, London, v. 425, p. 361, 2003.

HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 5, p. 267-293, 2004.

HOSE, E. et al. The exodermis: a variable apoplastic barrier. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 2245–2264, 2001.

HUANG, S.; COLMER, T. D.; MILLAR, A. H. Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPI? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 222-227, 2008.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, New York, v. 241, p. 3–17, 2010.

JACKSON, M. B.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 1, p. 274–287, 1999.

JACKSON, M. B.; DREW, M. C. Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Flooding and plant growth**. New York: Academic, 1984. p. 47-128.

JACKSON, M. B.; ISHIZAWA, K.; ITO, O. Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. **Annals of Botany**, London, v. 103, p. 137–142, 2009.

JARVIS, M. C. Plant cell walls: Supramolecular assemblies. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 257–262, 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

JOHNSON, P. R.; ECKER, J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. **Annual Reviews Genetic**, Palo Alto, v. 32, p. 227–54, 1998.

JOSHI, R.; KUMAR, P. Lysigenous aerenchyma formation involves non-apoptotic programmed cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. **Physiology Molecular Biology Plants**, Heidelberg, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2012.

JUNK, W. J. Wetlands of tropical South America. In: WHIGHAM, D. F.; HENY, S.; DYKYLOVA, D. (Ed.). **Wetlands of the world I**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 679-739.

JUSTIN, S.; ARMSTRONG, W. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa*). **New Phytologist**, Cambridge, v. 118, p. 49–62, 1991.

KAYSHAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 215-27, 2001.

KENDRICK, M. D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 479–485, 2008.

KÖGEL-KNABNER, I. et al. Biogeochemistry of paddy soils. **Geoderma**, Amsterdam, v. 157, p. 1-14, 2010.

KUROYANAGI, M. et al. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, p. 32914–32920, 2005.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, London, v. 411, n. 848–853, 2001.

LENOCHOVÁ, Z.; SOUKUP, A.; VOTRUBOVÁ, O. Aerenchyma formation in maize roots. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, p. 263-270, 2009.

LONE, A. A.; WARSI, M. Z. K. Response of Maize (*Zea mays* L.) To Excess Soil Moisture (ESM) Tolerance at Different Stages of Life Cycle. **Botany Research International**, Deira, v. 2, n. 3, p. 211-217, 2009.

LOPES, M. J. C. et al. Oxidação protéica e peroxidação lipídica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho ‘Saracura’, sob encharcamento contínuo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 3, p. 362-373, 2005.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 506-577, 2002.

MAGALHÃES, P. C. et al. Influência do cálcio na tolerância do milho “Saracura” BRS-4154 ao encharcamento do solo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 1, p. 40-49, 2007.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MANCUSO, S.; SHABALA, S.; PANG, J. **Waterlogging signalling and tolerance in plants**. Berlin: Springer, 2010. p. 197-219.

MANO, Y.; OMORI, F. Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segments from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays* subsp. *mays*). **Annals of Botany**, London, v. 112, p. 1125–1139, 2013.

MARINO, D. et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.

MARINO, D. et al. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. **New phytologist**, Cambridge, v. 189, n. 2, p. 580-592, 2011.

MEDRI, C. et al. Soil flooding affects the survival, growth and metabolism of *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae)? **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 123-134, 2012.

MELO, H. C. et al. Influência da aplicação de cálcio e alagamento do solo sobre características anatômicas das folhas de milho (*Zea mays* L.) “Saracura” BRS-4154. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 3, p. 333-342, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1958.

MILLER, G.; SHULAEV, V. MITTLER, R. Reactive oxygen signalling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 133, p. 481–489, 2008.

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

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 266–277, 2008.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459–81, 2007.

MUSTROPH, A. et al. Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen stress highlights conserved and plant-specific responses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 152, p. 1484–1500, 2010.

MUTLU, M. et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: Viscometric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 41, p. 147, 1999.

OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; KANGASJARVI, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 8, p. 335–342, 2003.

PARENTONI, S. N. et al. Seleção para tolerância ao encharcamento em milho (*Zea mays* L.). Selection for tolerance to waterlogging in maize (*Zea mays* L.) In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1., 1992, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. p. 434-449.

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. **Memórias...** Colômbia: CORPOICA/CIMMYT, 1997. p. 368-373.

PARLANTI, S. et al. Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance. **Annals of Botany**, London, v. 107, p. 1335–1343, 2011.

PATEL, P. K. et al. Flooding: abiotic constraint limiting vegetable productivity. **Advances in Plants & Agriculture Research**, Edmond, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2014.

PENNELL, R. I.; LAMB, C. Programmed cell death in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1157–1168, 1997.

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, 2010.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, 2008.

PETROV, V. D.; VAN BREUSEGEM, F. Hydrogen peroxide: a central hub for information flow in plant cells. **AoB PLANTS**, Oxford, v. 1, p. 1-13, 2012.

PIRRUNG, M. C. Histidine kinases and two-component signal transduction systems. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 6, p. 167–175, 1999.

POORTER, H. Plant growth analysis: towards a synthesis of the classical and the functional approach. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 75, p. 237-244, 1989.

PORTO, B. N. et al. Calcium-Dependent tolerant response of cell wall in maize mesocotyl under flooding stress. **Journal of Agronomy Crop Science**, Oxford, v. 199, p. 134–143, 2013.

PURNOBASUKI, H.; SUZUKI, M. Aerenchyma tissue development and gas-pathway structure in root of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Journal Plant Research**, Tokyo, v. 118, n. 4, p. 285-94, 2005.

QUAN, L. J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 2–18, 2008.

RAJHI, I. et al. Identification of genes expressed in maize root cortical cells during lysigenous aerenchyma formation using laser microdissection and microarray analyses. **New Phytologist**, Cambridge, v. 190, p. 351–368, 2011.

RAVANEL, S. et al. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings National Academic Science**, Washington, v. 95, n. 13, p. 7805–7812, 1998.

RODIONOVA, N. A. et al. Formation of extracellular enzyme systems during the growth of *Geotrichum candidum* 3C on Cell walls isolated from cereal grain coats. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 37, n. 5, p. 480–482, 2001.

SAGI, M.; FLUHR, R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, p. 336–340, 2006.

SAIRAM, R. K. et al. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, p. 401–412, 2008.

SARKAR, P.; GLADISH, D. K. Hypoxic stress triggers a programmed cell death pathway to induce vascular cavity formation in *Pisum sativum* roots. **Physiologia Plant**, Berne, v. 146, n. 4, p. 413–26, 2012.

SCHMIDT, F. et al. Impacto do manejo da água na toxidez por ferro no arroz irrigado por alagamento. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 37, p. 1226–1235, 2013.

SEAGO JUNIOR, J. L. et al. A Re-examination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to Aerenchyma. **Annals of Botany**, London, v. 96, p. 565–579, 2005.

SELING, S. et al. Calcium deficiency in potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) leaves and its effects on the pectic composition of the apoplastic fluid. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, p. 44–50, 2000.

SHABALA, S. et al. Expression of animal CED-9 anti-apoptotic gene in tobacco modifies plasma membrane ion fluxes in response to salinity and oxidative stress. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 189–197, 2007.

SHABALA, S. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. **New Phytologist**, Cambridge, v. 3, p. 1–10, 2010.

SHABALA, S. Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 709–712, 2009.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 9-23, 1993.

SILVA, S. D. A. et al. Inheritance of tolerance to flooded soils in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 7, n. 165-172, 2007.

SOUZA, K. R. D. **Desenvolvimento de aerênquimas e atividade enzimática em raízes de milho sob encharcamento**. 2010. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SOUZA, T. C. et al. Early characterization of maize plants in selection cycles under soil flooding. **Plant Breeding**, Berlin, v. 131, p. 493-501, 2012.

SOUZA, T. C. et al. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 16-24, 2010.

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

SOUZA, T. C. et al. Morpho-physiology and maize grain yield under periodic soil flooding in successive selection cycles. **Acta Physiology Plant**, Heidelberg, v. 33, p. 1877–1885, 2011.

SOUZA, T. C. et al. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 35, p. 3201–3211, 2013.

STEFFENS, B.; SAUTER, M. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 375-378, 2010.

STEFFENS, B.; STEFFEN-HEINS, A.; SAUTER, M. Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. **Frontiers in Plants Science**, Lausanne, v. 4, p. 179, 2013.

STEFFENS, B. The role of ethylene and ROS in salinity, heavy metal, and flooding responses in rice. **Frontiers in Plants Science**, Lausanne, v. 5, n. 685, p. 1-5, 2014.

STEPANOVA, A. N.; ALONSO, J. M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 548–555, 2009.

SUBBAIAH, C. C.; SACHS, M. M. Molecular and Cellular Adaptations of Maize to Flooding Stress. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 2, p. 119-127, 2003.

SUHARSONO, U. et al. The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, p. 13307-13312, 2002.

SUZUKI, N. et al. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, p. 691–699, 2011.

THEOLOGIS, A. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. **Cell**, Cambridge, v. 70, n. 24, p. 181-184, 1992.

THIRUNAVUKKARASU, N. et al. Genome-Wide expression of transcriptomes and their Co-Expression Pattern in Subtropical Maize (*Zea mays* L.) under waterlogging stress. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion Plant Biology**, Oxford, v. 8, p. 397–403, 2005.

TROUGHT, M. C. T.; DREW, M. C. The development of waterlogging damage in young wheat plants in anaerobic solution cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, p. 1573–1580, 1980.

TSUKUDA, K. et al. Rice receptor for chitin oligosaccharide elicitor does not couple to heterotrimeric G-protein: Elicitor response of suspension cultured rice cells from Daikoku *dwarf* (*d1*) mutants lacking a functional G-protein α -subunit. **Physiology Plant**, Berne, v. 116, p. 373-82, 2002.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 49-53, 1998.

UTHSCSA image tool: image processing and analyses program: version 3.0. San Antonio: University of Texas, 2002. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>>. Acesso em: 22 jun. 2014.

VANDENBUSSCHE, F. et al. Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. **New Phytologist**, Cambridge, v. 194, p. 895–909, 2012.

VAN DOORN, W. G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 1-13, 2011.

VAN DOORN, W. G.; WOLTERING, E. J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, p. 117–122, 2005.

VAN HAUTEGEM, T. et al. Only in dying, life: programmed cell death during plant development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 102-113, Feb. 2015.

VAUCHERET, H. et al. Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 651–659, 1998.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, p. 59–66, 2000.

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

VOESENEK, L. A. C. J.; PIERIK, R. Plant stress profiles. **Science**, Washington, v. 320, p. 880–881, 2008.

VOESENEK, L. A. C. J.; SASIDHARAN, R. Ethylene: and oxygen signalling – drive plant survival during flooding. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 15, p. 426–435, 2013.

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

WANG, F. et al. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 6, p. 650–657, 2009.

WANG, K. L. C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 131–151, 2002. Suppl.

WATANABE, K. et al. Does suberin accumulation in plant roots contribute to waterlogging tolerance? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 178, p. 1-7, 2013.

WOLTERING, E. J.; VAN DER BENT, A.; HOEBERICHTS, F. A. Do plant caspases exist? **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, p. 1764–1769, 2002.

WURGLER-MURPHY, S. M.; SAITO, H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 172–176, 1997.

XU, Q. T. et al. Process of aerenchyma formation and reactive oxygen species induced by waterlogging in wheat seminal roots. **Planta**, Berlin, v. 238, n. 5, p. 969-982, 2013.

YAMAUCHI T. et al. Aerenchyma formation in crop species: a review. **Field Crop Research**, Oxford, v. 152, p. 8-16, 2013.

YAMAUCHI, T. et al. Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 261–273, 2014.

YAMAUCHI, T.; RAJHI, I.; NAKAZONO, M. Lysigenous aerenchyma formation in maize root is confined to cortical cells by regulation of genes related to generation and scavenging of reactive oxygen species. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 6, n. 5, p. 759-761, 2011.

YANG, C. Y. Hydrogen peroxide controls transcriptional responses of ERF73/HRE1 and ADH1 via modulation of ethylene signaling during hypoxic stress. **Planta**, Berlin, v. 239, p. 877–885, 2014.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Bethesda, v. 35, p. 155–89, 1984.

YORDANOVA, R. Y; POPOVA, L. P. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. **Acta Physiology Plant**, Heidelberg, v. 29, p.535–541, 2007.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, n. 8, p.661–669, 2010.